

Titre: Plateforme microfluidique en polymère intégrant une
microélectrode ionique sélective pour la détection de la mort
cellulaire
Title:

Auteur: Caroline Miville-Godin
Author:

Date: 2009

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Miville-Godin, C. (2009). Plateforme microfluidique en polymère intégrant une
microélectrode ionique sélective pour la détection de la mort cellulaire [Mémoire
de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/8500/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/8500/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:**
Advisors:

Programme: Non spécifié
Program:

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[•]

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

PLATEFORME MICROFLUIDIQUE EN POLYMÈRE
INTÉGRANT UNE MICROÉLECTRODE IONIQUE SÉLECTIVE
POUR LA DÉTECTION DE LA MORT CELLULAIRE

CAROLINE MIVILLE-GODIN
DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
D'UN DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE PHYSIQUE)
AOÛT 2009



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-57268-9
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-57268-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

PLATEFORME MICROFLUIDIQUE EN POLYMÈRE
INTÉGRANT UNE MICROÉLECTRODE IONIQUE SÉLECTIVE
POUR LA DÉTECTION DE LA MORT CELLULAIRE

présenté par: MIVILLE-GODIN, Caroline

en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. WERTHEIMER Michael R., D.Sc.A., président

M. GUENAT Olivier, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. IZQUIERDO Ricardo, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je désire remercier mon directeur de recherche, le Professeur Olivier Guenat. Je vous remercie pour toutes les connaissances partagées, pour votre soutien et votre confiance. Merci pour la passion que vous m'avez transmise et qui inspire tous ceux avec qui vous travaillez.

Un grand merci au Professeur Michael Wertheimer pour ses conseils et son support ainsi qu'à Luke MacQueen, pour son aide précieuse et sa disponibilité.

Merci à Dre Silvia Generelli et à toute l'équipe du Laboratoire BioMEMS.

Merci au Laboratoire de MicroFabrication de Polytechnique et au Laboratoire CRN2 de l'Université Sherbrooke. Merci à Olivier Frey et au Laboratoire SamLab de l'Université de Neuchâtel.

Merci au Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB) pour son support financier.

Finalement, je remercie ma famille pour leur amour et leurs encouragements. Merci d'être toujours là pour moi.

RÉSUMÉ

Pour étudier la réaction de cellules exposées à divers environnements et agents, il est avantageux d'incorporer des micropuits de culture cellulaire aux laboratoires-sur-puce (*lab-on-a-chip*). Ce sont les microdétecteurs intégrés à la plateforme microfluidique qui rendent possible la caractérisation de l'évolution des fonctions cellulaires. Dans ce travail de maîtrise, l'objectif est de concevoir une plateforme microfluidique polymérique intégrant un micropuits de culture cellulaire capable de détecter la mort cellulaire.

Le polydiméthylsiloxane (PDMS) est le polymère choisi pour fabriquer cette plateforme microfluidique en raison de sa transparence aux longueurs d'onde du visible, permettant l'observation cellulaire par microscopie inversée. De plus, sa grande perméabilité aux gaz permet l'intégration facile de cultures cellulaires. La rapidité et le faible coût de la microfabrication du PDMS par la technique du prototypage rapide permettent de créer des plateformes jetables, ce qui est une caractéristique nécessaire pour les essais biomédicaux.

La détection d'ions K^+ permet d'étudier les fonctions de mort cellulaire, car les flux potassiques extracellulaires sont des indicateurs précoces de celle-ci. Les électrodes de type ioniques sélectives sont idéales pour ce projet, puisqu'elles convertissent l'activité de ces ions libres en potentiel électrique. Les électrodes ioniques sélectives ont l'avantage de ne pas nécessiter de traceur, ainsi que d'avoir une grande sélectivité et un temps de réponse court, permettant des mesures en temps réel.

La plateforme microfluidique qui intègre une microélectrode ionique sélective et un micropuits cellulaire se compose de deux parties. La première, faite de PDMS, est constituée d'un microcanal reliant deux réservoirs. Elle est fabriquée en moulant le

PDMS sur un moule de photorésine épaisse microstructurée par photolithographie. Les dimensions du microcanal rectangulaire sont de $50\mu\text{m}$ de largeur et $65\mu\text{m}$ de hauteur et chacun des réservoirs cylindriques a un volume de 250nL . La deuxième partie de la plateforme est un substrat de verre sur lequel une micropiste de platine est structurée par un procédé *lift-off*. L'assemblage des deux parties est réalisé en centrant le microcanal de PDMS sur la micropiste de platine.

La dernière étape de fabrication de la plateforme est l'introduction de la solution sélective à l'ion K^+ dans le premier réservoir. Cette solution, appelée membrane ionique sélective, contient un ionophore pouvant se lier réversiblement à l'ion potassium, ce qui lui confère sa sélectivité. Cette solution recouvre la micropiste de platine en remplissant tout le microcanal grâce aux forces de tension de surface. Cette solution devient ensuite solide après l'évaporation du solvant qu'elle contient. Le deuxième réservoir, qui sert de micropuits cellulaire, est donc en contact avec la membrane ionique sélective sur une surface de $50\mu\text{m} \times 65\mu\text{m}$. Étant donné la toxicité de cette membrane, ce design a l'avantage de minimiser la surface de contact avec le milieu cellulaire, tout en assurant une bonne stabilité des mesures grâce à l'ancrage de la membrane à l'intérieur du microcanal ainsi qu'au grand réservoir de membrane.

La fonctionnalité de l'électrode sélective au K^+ intégrée à la plateforme est caractérisée par la mesure de sa sensibilité. La plateforme est placée dans un dispositif fluide qui fait circuler une série de solutions de différentes concentrations en potassium ($[\text{K}^+]$) dans le réservoir conçu pour la culture cellulaire. Une électrode de référence est incluse dans ce dispositif et baigne dans les mêmes solutions. Les variations de différences de potentiel entre l'électrode ionique sélective et l'électrode de référence sont enregistrées via la piste de platine. Les variations de différences de potentiel en fonction de la concentration de l'ion K^+ sont décrites par l'équation de Nernst. On observe typiquement une variation de 59 mV par décade de $[\text{K}^+]$, notée pK^+ , pour des concentrations de K^+ de $10^{-5}\text{ M} < [\text{K}^+] < 0,1\text{ M}$.

Le concept d'intégration d'une électrode ionique sélective au PDMS est d'abord vérifié en utilisant une électrode aux dimensions macroscopiques. Une réponse quasi-Nernstienne a été obtenue et est demeurée stable pour plus de 4 jours. Cependant, sa sensibilité diminue et son temps de vie s'avère inférieur à 8 jours. Cette dégradation est probablement causée par l'incompatibilité entre le PDMS et le solvant contenu dans la membrane ionique sélective. En effet, le cyclohexanone contenu dans la membrane endommage le PDMS en le dissolvant et en le déformant, ce qui altère l'adhésion entre le PDMS et le verre et nuit au contact entre la membrane et le platine.

Dans le but d'augmenter la durée de vie de l'électrode ionique sélective, il faut protéger le PDMS du cyclohexanone par une barrière de diffusion placée entre la membrane et le PDMS. Cette barrière doit avoir une bonne résistance chimique, une grande résistivité électrique, être transparente et ne doit pas interférer avec l'électrode ionique sélective. Suite à l'inefficacité des barrières de diffusion créées par le traitement de surface du PDMS par UV/O₃ et par le dépôt *sol-gel*, le choix s'est tourné vers le dépôt d'une couche mince de SiO₂ (150nm) par *plasma-enhanced chemical vapour deposition* (PECVD). Le SiO₂ semble être idéal en raison de son caractère chimiquement inerte, de sa robustesse et de ses caractéristiques diélectriques. Cependant, la manipulation de l'échantillon déforme le PDMS et crée une contrainte mécanique dans la couche rigide de SiO₂, ce qui engendre des fissures. Afin d'éviter celles-ci, il faut réduire la différence d'épaisseur entre le PDMS et le SiO₂, conformément à l'équation de Stoney. Cependant, pour la validation du concept réalisé à l'aide d'une macroélectrode, il s'avère difficile de travailler avec un dispositif dont l'épaisseur est inférieure au millimètre. Le choix se tourne donc vers une barrière flexible, comme le Parylène. Grâce à une couche de 5µm déposée à température ambiante, l'électrode ionique sélective conserve une sensibilité de 57 mV/pK⁺ qui demeure stable pour plus d'une semaine.

L'électrode ionique sélective aux dimensions micrométriques (50 μ m x 65 μ m) démontre une réponse quasi-Nernstienne de 55 mV/pK⁺. Grâce à un essai cellulaire préliminaire, il a été possible de détecter les flux potassiques extracellulaires avec cette microélectrode ionique sélective. Cet essai consiste en l'induction d'un choc hypoosmotique aux cellules de fibroblastes d'embryons de souris afin qu'elles activent leur mécanisme de *Regulatory Volume Decrease (RVD)* lors duquel des flux potassiques extracellulaires sont émis. En maintenant ces conditions hypoosmotiques, le *RVD* ne suffit plus et il y a mort cellulaire par nécrose. Le succès des essais cellulaires nous permet donc de conclure qu'il est possible de détecter la mort cellulaire avec une microélectrode ionique sélective intégrée à une plateforme microfluidique en PDMS.

ABSTRACT

In order to study the reaction of cells exposed to various environments and agents, it is helpful to integrate microwells for cellular culture in a “lab-on-a-chip”. For the characterization of the time evolution of cellular functions, microsensors are integrated into a microfluidic platform. During this M.Sc.A project, the objective has been to design a microfluidic platform made of a polymer that integrates a cellular culture microwell, able to detect cell death.

Polydimethylsiloxane (PDMS) is the polymer chosen to create the microfluidic platform because of its transparency at visible wavelengths, allowing the cellular observation by inverse microscopy. Moreover, its great permeability to gases allows the easy integration of cellular cultures. Rapidity and low cost of PDMS microfabrication by the technique of rapid prototyping allows one to create disposable platform, which represents an important characteristic for biomedical applications.

With the detection of K^+ ions, it is possible to study cell death, because extracellular potassium effluxes are early indicators of such cell death. Ion-selective electrodes are well suited for this project, since they convert the activity of free ions into an electric potential. Ion-selective electrodes do not require any tracer, they have a great selectivity and a rapid response time, thereby allowing measurements in real-time.

The microfluidic platform which integrates an ion-selective microelectrode and a cellular microwell is composed of two parts. The first, made of PDMS, consists of a microchannel connecting two reservoirs. It is microfabricated by moulding the PDMS on a thick layer of photoresist that has been microstructured by photolithography. Rectangular microchannel dimensions are of 50 μ m width and 65 μ m height and each cylindrical reservoir has a 250nL volume. The second part of the platform is a glass

substrate on which a platinum microstrip is fabricated by a lift-off process. The assembly of the two parts is achieved by centering the microchannel of PDMS on the platinum microstrip.

The last step of fabrication is the introduction of the K^+ -selective solution into the first reservoir. The solution covers the platinum microstrip by completely filling the microchannel, and it reaches the second reservoir by capillarity forces. This solution, called ion-selective membrane, becomes solid after the evaporation of its solvent. The second reservoir, used as a cell microwell, is thus in contact with the ion-selective membrane on a surface of $50\mu m \times 65\mu m$. Because of the toxicity of the membrane, this design has the advantage of minimizing the surface of contact with the cell medium, while ensuring a good stability of measurements, thanks to anchoring of the membrane inside the microchannel and relatively to the large membrane reservoir.

The functionality of the K^+ -selective electrode within the platform is characterized by measurement of its sensitivity. The platform is placed in a fluidic manifold which circulates a series of solutions of varying potassium concentrations ($[K^+]$) in the reservoir designed for the cell culture. A reference electrode is included in the manifold, and it bathes in the same solutions. Variations in potential differences between the ion-selective electrode and the reference electrode are recorded via the platinum microstrip. These potential difference variations versus K^+ concentration are described by the Nernst equation. A variation of 59 mV is typically observed per decade of $[K^+]$, noted pK^+ , for ion concentrations of $10^{-5} M < [K^+] < 0,1 M$.

The concept of integration of an ion-selective electrode into a PDMS platform was initially verified by using an electrode of macroscopic dimensions. A quasi-Nernstian response was obtained and it remained stable for more than 4 days. However, its sensitivity decreased and its survival appeared to be less than 8 days. This degradation is probably caused by incompatibility between the PDMS and solvent contained in the

ion-selective membrane. Indeed, cyclohexanone contained in the membrane damages the PDMS by dissolving and deforming it, which results in deterioration of the adhesion between the PDMS and glass and weakens the contact between the membrane and the platinum.

In order to raise the lifetime of the ion-selective electrode, it is necessary to protect the PDMS from cyclohexanone by a diffusion barrier placed between the membrane and the PDMS. This barrier must have a good chemical resistance, a large electrical resistance, it must be transparent and not interfere with the ion-selective electrode. Diffusion barriers created by the deposition by sol-gel chemistry and by UV/O₃ treatment proved inefficient, but a better option was deposition of a thin SiO₂ layer (150nm) by plasma-enhanced chemical vapour deposition (PECVD). The SiO₂ is well-suited for diffusion barrier because of its chemically inert character, its robustness and its dielectric properties. However, handling of the sample deforms the PDMS and creates a mechanical stress in the rigid SiO₂ layer, which in turn generates cracks. In order to avoid these, it is necessary to reduce the difference in thickness between the PDMS and SiO₂, in accordance to the Stoney equation. However, for proof-of-concept performed with a macroscopic electrode, it is difficult to work with a device of total thickness less than a millimeter. The choice thus turns to a flexible diffusion barrier, like Parylene. Thanks to a layer of 5µm deposited at room temperature, the ion-selective electrode preserves a sensitivity of 57 mV/pK⁺, which remains stable for more than one week.

An ion-selective electrode with micrometric dimensions (50µm x 65µm) shows a quasi-Nernstian response of 55 mV/pK⁺. With a preliminary cellular essay, it was possible to detect extracellular potassium effluxes with an ion-selective microelectrode. This test comprises inducing a hypoosmotic shock to the cells (mouse embryo fibroblasts), to make them activate their mechanism of Regulatory Volume Decrease (RVD), during which extracellular potassium effluxes are emitted. By maintaining these hypoosmotic conditions, the RVD is not able to restore equilibrium and cells suffer necrosis. The

success of the cellular essays enables us to conclude that it is possible to detect cellular death with an ion-selective microelectrode integrated into a microfluidic platform made of PDMS.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	IX
TABLE DES MATIÈRES	XIII
LISTE DES TABLEAUX	XV
LISTE DES FIGURES	XVI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIX
LISTE DES ANNEXES	XXI
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	5
2.1 Culture cellulaire intégrée aux microplateformes	5
2.2 Microélectrodes ioniques sélectives et cultures cellulaires	6
2.3 Substrats polymériques	9
CHAPITRE 3 : ASPECTS THÉORIQUES	12
3.1 Électrode ionique sélective	12
3.2 Propriétés du polydimethylsiloxane	16

3.3 Mort cellulaire	17
CHAPITRE 4 : MÉTHODOLOGIE ET FABRICATION	19
4.1 Matériel	19
4.1.1 Membrane ionique sélective et solutions standard	19
4.1.2 Composants et protocole pour la culture cellulaire	20
4.2 Design et méthodes de fabrication	21
4.2.1 Plateforme cellulaire microfluidique avec microélectrode ionique sélective	21
4.2.2 Barrière de diffusion.....	26
4.3 Instrumentation, montages expérimentaux et protocoles	30
4.3.1 Mesures potentiométriques.....	30
4.3.2 Protocole des essais cellulaires.....	33
CHAPITRE 5 : RÉSULTATS ET ANALYSE.....	35
5.1 Électrode ionique sélective intégrée dans le PDMS.....	35
5.2 Barrière de diffusion.....	38
5.2.1 Procédé <i>sol-gel</i> et traitement du PDMS	38
5.2.2 Dépôt de SiO ₂ par <i>PECVD</i> sur le PDMS	39
5.2.3 Dépôt de Parylène sur le PDMS	46
5.3 Microélectrode ionique sélective intégrée au PDMS	48
5.4 Essais de détection de la mort cellulaire	49
5.4.1 <i>MacroISE</i>	49
5.4.2 <i>MicroISE</i>	51
CONCLUSION	54
LISTE DES RÉFÉRENCES	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 : Concentration ionique du K^+ et du Na^+ pour les cellules mammifères.....	17
Tableau 5.1 : Solvation d'un bloc de PDMS (15mm x 5mm x 5mm) immergé dans le cyclohexanone.	37
Tableau 5.2 : Propriétés physiques du PDMS et du SiO_2	40
Tableau 5.3 : Propriétés mécaniques et électriques du PDMS et du Parylène C.	46

LISTE DES FIGURES

Figure 3.1 : Composants d'une électrode ionique sélective. L'échantillon représente la solution contenant l'ion cible.	13
Figure 3.2 : Courbe théorique de la fem mesurée en fonction du logarithme de l'activité ionique de K^+ , où la pente est représentative de la loi de Nernst.	15
Figure 4. 1 : Vue en coupe du dispositif (non à l'échelle). La membrane ionique sélective prend la forme du microcanal et expose une surface ($50\mu m \times 65\mu m$) à la solution physiologique présente dans le puits cellulaire. Du côté opposé, la membrane ionique sélective est en contact avec l'électrode interne de Pt.....	24
Figure 4. 2 : Plateforme en PDMS intégrant une macroISE ($\varnothing 2mm$).	25
Figure 4. 3 : Montage expérimental du réacteur <i>RF-PECVD</i> [35]	27
Figure 4. 4 : Dépôt de Parylène (Appareil <i>Speciality coating system labcoater 2</i> du LMF).	28
Figure 4. 5 : Montage expérimental pour essais électrochimiques avec la plateforme microfluidique en PDMS avec une macroISE.....	30
Figure 4. 6 : Montage expérimental pour essais électrochimiques avec la plateforme microfluidique en PDMS avec une microISE.	32

- Figure 4. 7 : Montage expérimental pour essais cellulaires avec les plateformes cellulaires microfluidique en PDMS avec a) macroISE et b) microISE. ...33
- Figure 5. 1 : Courbe de calibration d'une électrode ionique sélective incorporée dans le PDMS. La force électromotrice (*EMF*, *electromotrice force*) en fonction de la concentration en ions potassium ($[K^+]$, échelle logarithmique) est mesurée directement après le séchage de la membrane ionique sélective (jour 1), après 4, puis 8 jours.....36
- Figure 5. 2 : Courbe de calibration d'une électrode ionique sélective incorporée au PDMS traité aux UV/O₃. La force électromotrice (*EMF*) en fonction de la concentration en ions potassium ($[K^+]$) est mesurée après le séchage de la membrane ionique sélective (jour 1) et après 8 jours.....39
- Figure 5. 3 : Image MEB de la surface du SiO₂ (115nm, n=1,47) déposé par PECVD sur du PDMS ($T_d = 85^\circ\text{C}$).41
- Figure 5. 4 : Surface du SiO₂ déposé par PECVD sur du PDMS ($T_d = 37^\circ\text{C}$) :.....42
- Figure 5. 5 : Images MEB du SiO₂ (173nm, n=1,43) déposé par PECVD sur du PDMS ($T_d = 33^\circ\text{C}$).43
- Figure 5. 6 : Image du SiO₂ ($d_{SiO_2} = 116\text{nm}$, n=1,46) déposé par PECVD sur du PDMS 44
- Figure 5. 7 : Image MEB du dispositif en PDMS avec un microcanal et deux réservoirs.46

- Figure 5. 8 : Courbe de calibration d'une *ISE* incorporée au PDMS sur lequel est déposé 5µm de Parylène. La force électromotrice (*EMF*) en fonction de la concentration en ions potassium ($[K^+]$, échelle logarithmique) est mesurée directement après le séchage de l'*ISE* (jour 1) et après 8 jours.....47
- Figure 5. 9 : Courbe de calibration quasi-Nernstienne d'une microélectrode ionique sélective incorporée au PDMS. La force électromotrice (*EMF*) est en fonction de la concentration en ions potassium ($[K^+]$, échelle logarithmique).48
- Figure 5.10 : Détection de flux potassiques extracellulaires avec une macro*ISE* intégrée dans une plateforme de PDMS avec barrière de diffusion (EDI : eau déionisée).50
- Figure 5.11 : Détection de flux potassiques extracellulaires avec une micro*ISE* intégrée dans une plateforme de PDMS (noir) et la courbe témoin (rouge)51

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

<i>AVD</i>	<i>Apoptotic Volume Decrease</i>
DDP	Différence de potentiel
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDI	Eau déionisée
<i>EMF</i>	<i>Electromotrice force</i>
ER	Électrode de référence
Fem	Force électromotrice
<i>ISE</i>	<i>Ion-selective electrode</i>
MEB	Microscope électronique à balayage
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDMS	Polydiméthylsiloxane
<i>PECVD</i>	<i>Plasma-enhanced chemical vapour deposition</i>
PMMA	<i>Poly(méthylméthacrylate)</i>
<i>PVC</i>	<i>Polyvinyl chloride</i>
<i>RF</i>	<i>Radio frequency</i>
<i>RVD</i>	<i>Regulatory volume decrease</i>
<i>TEOS</i>	<i>Tetraéthyl orthosilicate</i>
$a_{I(aq)}$	Activité ionique en solution aqueuse
d_{PDMS}	Épaisseur du PDMS
d_{SiO_2}	Épaisseur de la couche mince de SiO ₂
E_M	Potentiel à l'interface membrane ionique sélective/échantillon
E_{PDMS}	Module de Young
F	Constante de Faraday
$I_{(aq)}$	Ion en solution aqueuse
n	Indice de réfraction
n	Valence de l'ion

pK^+	Décade de concentration en potassium
R	Constante universelle des gaz
T	Température
T_d	Température de dépôt par <i>PECVD</i>
$\gamma_{l(aq)}$	Coefficient d'activité de l'ion en solution aqueuse
κ	Courbure imposée (déformation)
ν	Coefficient de Poisson
σ	Contrainte

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I : MICROFABRICATION DE LA PLATEFORME.....	60
---	----

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Les connaissances avancées en chimie organique et en génomique appliquée ont contribuées grandement au développement de nouveaux médicaments. L'étape limitante n'est plus la synthèse des composants ou l'identification des cibles, mais la validation de l'agent. Lors d'une recherche de nouveaux médicaments, il faut tester un très grand nombre d'agents potentiels et être en mesure d'identifier le plus tôt possible ceux qui ont une forte probabilité de devenir un médicament commercialisable [1], ou, inversement, ceux qui sont toxiques.

Les procédés employés traditionnellement par les compagnies pharmaceutiques pour la recherche de nouveaux médicaments suivent tous une même ligne directrice. On teste d'abord l'interaction et la liaison entre une protéine cible et quelques molécules susceptibles de répondre aux besoins du médicament. Les molécules qui se lient avec une certaine efficacité sont conservées afin de créer une classe initiale de composants. Les candidats sont alors progressivement éliminés par une série d'essais de toxicité *in vivo*. Étant donné le coût de ces essais, il est avantageux de réduire au minimum le nombre de composants de cette classe initiale.

Pour ce faire, les tests préliminaires de liaison entre la protéine cible et le médicament potentiel auraient avantage à fournir aussi des informations préliminaires sur la toxicité de l'agent testé. Il serait avantageux de réaliser ces tests de liaisons au sein d'une culture cellulaire et d'étudier l'évolution des fonctions cellulaires en présence de l'agent. Ceci fournirait des informations préliminaires au sujet de la toxicité de l'agent.

En comparaison aux tests *in vivo*, les tests *in vitro* représentent des coûts faibles et permettent de réduire le temps des essais. Cependant, puisque le modèle cellulaire *in vitro* n'est pas représentatif en tout point de la réponse *in vivo*, les tests *in vivo*

demeurent une étape essentielle du processus de validation des nouveaux médicaments. Dans ce contexte, la miniaturisation des systèmes pour essais cellulaires qui sont spécialement désignés pour reproduire le comportement *in vivo* ont la capacité d'augmenter la capacité à la prédiction pour le processus de découverte [1].

Les tests *in vivo* traditionnels, comme les essais *in vitro*, sont des modèles toxicologiques simplifiés avec leurs limites intrinsèques qui se basent sur des hypothèses fondamentales. La toxicologie traditionnelle émet l'hypothèse que la réponse animale est représentative de la réponse de l'organisme humain en présence du même agent. La toxicologie *in vitro* quant à elle, se base sur l'hypothèse que les effets d'un agent sur une culture cellulaire humaine sont représentatifs de la réponse chez l'humain.

En utilisant les technologies développées au niveau des laboratoires-sur-puce (*lab-on-chip*), on peut créer une plateforme qui intègre un grand nombre de puits cellulaires dans le but de les exposer à différents agents à tester. Avec ce design, il est possible de tester plusieurs populations de cellules, représentant par exemple, les principaux organes humains. Ce type d'essai cytotoxicologique réalisé sur un laboratoire-sur-puce promet de réduire considérablement les quantités de réactifs et d'agents nécessaires aux processus de validation de nouveaux médicaments. Il permet aussi de diminuer le temps nécessaire pour obtenir un profil de toxicité en parallélisant les essais et il diminue le personnel opérant en facilitant l'automatisation et en augmentant la reproductibilité des essais [2]. Les essais cytotoxicologiques permettent également d'éviter les problématiques éthiques rencontrées lors des essais traditionnels effectués *in vivo*.

Pour ce faire, il faut être en mesure d'exposer les cellules aux différents agents à tester et de détecter la réponse cellulaire face à cette exposition. En plus des éléments microfluidiques et des cultures cellulaires, la plateforme pour essais cytotoxicologiques doit intégrer des éléments de détection. Elle doit permettre l'observation de l'évolution des fonctions cellulaires comme le taux de mortalité, les mutations, le développement de

cancer etc. L'intégration de tous ces composants sur une même plateforme présente plusieurs défis [3]. Dans ce travail, on se concentre spécialement au développement d'un détecteur micrométrique pouvant s'intégrer à une culture cellulaire sur puce. On s'intéresse particulièrement à la détection des fonctions de mort cellulaire en temps réel.

Les deux processus principaux de mort cellulaire sont la nécrose et l'apoptose. Ceux-ci induisent des flux potassiques extracellulaires qui sont des marqueurs précoces de la mort cellulaire [4]. Dans le cas de la nécrose, le potassium s'échappe des cellules mourantes suite à la rupture de la membrane cellulaire. Lors de l'apoptose, un mouvement d'ions potassium accompagne la perte de volume de la cellule apoptotique [5]. Ces signaux cellulaires peuvent être détectés par une électrode ionique sélective qui présente l'avantage de pouvoir être miniaturisée et qui ne nécessite pas de traceur additionnel. Récemment, le laboratoire du Pr. Guenat a développé une plateforme microfluidique intégrant des microélectrodes sélectives au K^+ capables de détecter et de quantifier la mort cellulaire en temps réel [4]. Ces résultats prometteurs ont été obtenus avec une plateforme microfluidique en silicium. Ce type de plateforme présente certains points faibles, dont une microfabrication dispendieuse et fastidieuse ainsi qu'une incompatibilité avec la microscopie inversée en raison de l'opacité du Si aux longueurs d'onde du visible.

L'objectif de ce projet est de concevoir une plateforme microfluidique polymérique qui comprend des micropuits de culture cellulaire et qui intègre un réseau de microélectrodes ioniques sélectives. Cette plateforme est similaire au prototype réalisé en silicium [4], mais elle présente l'avantage d'être transparente aux longueurs d'onde du visible et elle peut être réalisée à plus faible coûts par la technique du prototypage rapide [6]. Ce dernier avantage est particulièrement important pour des applications de cultures cellulaires pour lesquels ces dispositifs sont à utilisation unique afin d'éviter les contaminations.

Le chapitre suivant résume brièvement la littérature qui traite des cultures cellulaires sur puce, des électrodes ioniques sélectives pour l'étude des signaux cellulaires et des substrats de polymères pour les plateformes microfluidiques avec micropuits cellulaires. Ensuite, le chapitre 3 présente les aspects théoriques nécessaires à la compréhension des travaux effectués au niveau des électrodes ioniques sélectives, du matériau polymère utilisé et des mécanismes de morts cellulaires. Le chapitre 4 regroupe la méthodologie et les méthodes de fabrication utilisées dans ce projet. On y présente aussi les montages expérimentaux et les protocoles utilisés lors des tests effectués sur la plateforme microfluidique intégrant une *microISE* (micro *ion-selective electrode*). La présentation des résultats et de leurs analyses font l'objet du chapitre 5, en particulier la stabilité à long terme des électrodes ioniques sélectives avec ou sans barrière de diffusion. Finalement, ce travail mène à la conclusion qu'il est possible d'intégrer une microélectrode ionique sélective à une plateforme microfluidique en polymère capable de détecter la mort cellulaire.

CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Ce chapitre débute par un survol de la littérature traitant des plateformes microfluidiques dédiées à la culture cellulaire, dans le but de faire ressortir les avantages et les enjeux de ces dispositifs. Par la suite, on s'intéresse particulièrement aux microplateformes cellulaires qui intègrent des électrodes ioniques sélectives. Les techniques récentes qui utilisent des polymères pour créer des micropuits cellulaires sont ensuite présentées. Toutes ces connaissances sont combinées afin de concevoir un design optimisé de plateforme microfluidique en polymère avec micropuits cellulaire intégrant une électrode ionique sélective. Ce chapitre met l'accent sur les éléments nouveaux mis de l'avant dans ce projet de maîtrise, qui à notre connaissance, n'ont encore jamais été étudiés.

2.1 Culture cellulaire intégrée aux microplateformes

L'origine de la microfluidique date des années 1990. La microfluidique a largement contribué à l'émergence des *lab-on-a-chip* (laboratoire sur puce), dispositif intégrant complètement ou partiellement un système de pompage de solutions aqueuses, un micromélangeur, un système d'analyse, etc. Les premières applications microfluidiques étaient essentiellement prévues pour l'analyse chimique, puis bio-chimique, d'échantillons ou de solutions aqueuses. Plus récemment, ces dispositifs ont été utilisés pour cultiver des cellules directement sur puce. Les dimensions micrométriques des canaux se sont révélées être un atout important pour contrôler spatialement et temporellement la croissance cellulaire. En effet, la dimension linéaire (10 à 100 μm) des cellules eucaryotes est très semblable à celle des microcanaux. Les plateformes microfluidiques sont des outils idéaux permettant aux biologistes d'étudier et de manipuler les cellules avec précision [7].

Garantir la viabilité et la fonctionnalité cellulaire sur puce est un processus complexe qui requiert une bonne maîtrise de la microfluidique et des techniques de micro-ingénierie de l'environnement cellulaire [8]. Les études actuelles tentent de reproduire un environnement cellulaire le plus représentatif possible de leur fonctionnement *in vivo* [9].

Grâce à la grande capacité d'intégration des plateformes microfluidiques, il est possible d'inclure un microsystème pouvant directement analyser certaines fonctions cellulaires. Il devient possible de modifier les conditions extracellulaires sur la plateforme et de mesurer les effets sur la culture cellulaire. Ces avancées permettent d'investiguer les fonctions cellulaires et sont particulièrement utiles dans ce projet lors du design du dispositif.

2.2 Microélectrodes ioniques sélectives et cultures cellulaires

L'analyse des fonctions cellulaires peut s'effectuer avec différents détecteurs, notamment à l'aide d'électrodes sélectives aux ions (*ion-selective electrode, ISE*), qui s'intègrent facilement dans un système microfluidique complexe [4]. Les électrodes ioniques sélectives permettent de mesurer la variation de concentration d'un ion en solution, notamment le Na^+ ou le K^+ , pour n'importe quel type de cellules. C'est une méthode efficace pour étudier plusieurs fonctions cellulaires qui impliquent des changements ioniques, comme dans le cas de la mort cellulaire (modification de la concentration de potassium).

L'intégration d'électrodes ioniques sélectives dans un dispositif microfluidique permet de créer une méthode d'analyse ionique rapide, ayant une grande sélectivité et une très bonne sensibilité [10]. Grâce aux avancements en microfabrication, des réseaux de microélectrodes ioniques sélectives ont été créés afin de permettre l'étude des signaux cellulaires. Le premier réseau de ce genre a été réalisé avec des électrodes planaires, de

quelques centaines de micromètres de diamètre, en déposant la membrane ionique sélective sur la surface de l'électrode [11]. L'adhésion de ce composant étant faible, l'électrode se détériore prématurément.

Récemment, l'équipe du Pr. Guenat a réalisé un réseau de microélectrodes ioniques sélectives en silicium ayant des dimensions inférieures au diamètre cellulaire. Celles-ci sont formées d'une micropipette connectée à un réservoir par un microcanal. La membrane ionique sélective est introduite dans ce réservoir et remplit le microcanal et la micropipette [4]. Dans cette plateforme microfluidique, c'est la prédominance des forces de tension de surface [12] qui permet de remplir la micropipette de membrane ionique sélective sans avoir recourt à aucun système de pompage externe. De plus, cette géométrie a permis de créer une surface active reproductible et stable, qui assure une encapsulation de la membrane et qui évite le problème d'adhésion rencontré avec les électrodes planaires. Également, le volume de membrane ionique sélective contenue dans le microcanal et le réservoir favorise la longévité du capteur [4]. Ce type de réseau s'est montré idéal pour étudier l'activité ionique dans les essais cellulaires *in vitro* et présente l'avantage de pouvoir réaliser des détections multiples [4].

Cette plateforme microfluidique permet de quantifier le nombre de cellules mourantes en évaluant la concentration de potassium extracellulaire. Ceci a été accompli en réalisant une comparaison entre les mesures potentiométriques et un essai *live/dead* en fluorescence sous les mêmes conditions. Une comparaison entre les deux mesures montrent clairement le délai entre les flux potassiques extracellulaires précédant la mort cellulaire mesurés par l'électrode ionique sélective et la nécrose cellulaire confirmée par les mesures en fluorescence [4]. Cette plateforme permet donc la détection des flux potassiques extracellulaires, qui sont des indicateurs précoces de mort cellulaire.

Étant donné le succès du design de la plateforme du Pr. Guenat, le travail présenté dans ce mémoire consiste en la conception d'une nouvelle version de cette plateforme microfluidique, qui s'inspire des points forts et compense les points faibles. Les points faibles majeurs de la plateforme en silicium sont essentiellement : son coût élevé, son long temps de fabrication et son opacité aux longueurs d'ondes du visible, ce qui rend la plateforme en Si inutilisable sous microscope inversé utilisé en biologie cellulaire.

Dans ce projet, il s'agit de créer une plateforme microfluidique avec micropuits cellulaire intégrant une microélectrode ionique sélective en utilisant un substrat polymérique transparent en remplacement du silicium. L'amélioration majeure apportée par ce projet est la transparence du substrat aux longueurs d'onde du visible. Ceci est primordial pour l'observation cellulaire par microscopie inversée, utilisée régulièrement en biologie cellulaire. Il sera donc possible d'observer par microscopie le comportement cellulaire en parallèle avec l'enregistrement des signaux potassiques. Deuxièmement, la fabrication par prototypage rapide (section 2.3) est nettement moins coûteuse que celle du silicium.

2.3 Substrats polymériques

La microfluidique a été développée grâce aux techniques de microfabrication utilisées en microélectronique, qui permettent de créer des microstructures faites de silicium et de verre [3]. Cependant, comme on le constate avec la microfabrication des micropipettes en silicium [4], la microfabrication de ces matériaux est assez longue et coûteuse.

Comme cela a été le cas dans plusieurs projets de plateforme microfluidiques, le coût de fabrication élevé du silicium et du verre a motivé le travail avec des polymères qui peuvent être moulés, par des techniques d'injection ou d'embossage [13]. L'utilisation de polymères est tout à fait adaptée aux essais biomédicaux, puisque leur faible coût de microfabrication permet de créer des dispositifs à usage unique et voués à une consommation de masse [6]. Dans la littérature scientifique, le matériel le plus courant est le PDMS, car il est peu cher et il peut être microstructuré par la technique du prototypage rapide. Cette nouvelle technique, proposée par l'équipe de Whitesides *et al.* en 2000 [14], permet de créer des microstructures rapidement et en plusieurs exemplaires, par le moulage de polymère sur un moule réutilisable. Le PDMS est particulièrement intéressant pour les plateformes microfluidiques, puisque son caractère déformable facilite l'intégration de divers composants de contrôle, comme les vannes et les pompes [3]. De plus, le PDMS est perméable aux gaz, il est biocompatible et il est très facile de le joindre à un autre matériel pour former des canaux étanches [15].

Ce projet a donc pour but de créer une nouvelle version en PDMS de la plateforme microfluidique avec micropuits cellulaire intégrant une électrode ionique sélective. Les avantages potentiels de ce nouveau prototype sont sa rapidité de microfabrication et son faible coût. Également, la transparence aux longueurs d'onde du visible est un avantage majeur duquel on pourra tirer profit lors des essais cellulaires.

Bien que le PDMS combine plusieurs avantages, son utilisation comme substrat comporte aussi des inconvénients. En effet, le PDMS est perméable, ce qui implique que le contenu d'un canal fait de PDMS peut s'évaporer à travers celui-ci. De plus, certains composants hydrophobes de petites tailles peuvent être absorbés de manière permanente dans le substrat de PDMS. Ces phénomènes doivent être pris en compte lors du design d'une plateforme microfluidique en PDMS.

Plusieurs travaux ont été réalisés dans le but d'améliorer la résistance chimique du PDMS à l'absorption de composants hydrophobes en modifiant la surface des microcanaux de différentes façons [13]. Plusieurs solutions impliquent le SiO_2 , étant donné son caractère chimiquement inerte et sa transparence [16]. De plus, le SiO_2 est un bon isolant électrique et thermique, il est hydrophile et ses caractéristiques de surface sont bien connues [13]. Il y a différentes façons de créer une barrière de diffusion en SiO_2 sur du PDMS :

- a) Dépôt *sol-gel*
- b) Dépôt par *PECVD* (*plasma-enhanced chemical vapor deposition*)
- c) Traitement par plasma O_2
- d) Traitement UV/O_3

Le procédé chimique *sol-gel* permet de former des particules inorganiques de SiO_2 dans la couche surfacique du PDMS [15]. Ce traitement crée une région près de la surface ayant une grande densité de SiO_2 distribuées de manière homogène, formant une couche inorganique poreuse. Cette couche permet d'éviter l'absorption et l'adsorption de composants hydrophobes [15] et crée un substrat de PDMS apte à supporter beaucoup plus d'applications. Il est également possible de déposer sur le PDMS une couche mince de SiO_2 par *PECVD* (*plasma-enhanced chemical vapor deposition*). Il existe aussi le traitement du PDMS par plasma d'oxygène qui crée une couche surfacique semblable au SiO_2 (*silica-like*), mais qui n'est pas très stable dans le temps [17]. Le traitement du

PDMS par UV/O₃, normalement utilisé dans le but d'améliorer l'adhésion cellulaire sur le PDMS [18], crée une couche semblable dont le temps de vie est prolongé.

Une alternative intéressante au SiO₂ pour la création d'une barrière de diffusion sur le PDMS est le Parylène. En effet, l'équipe de Shin *et al.* dépose une couche de ce polymère à l'intérieur de leurs microcanaux de PDMS afin d'éviter l'évaporation de leurs échantillons lors d'un procédé nommé *polymerase chain reaction (PCR)* [19]. Cette méthode est aussi considérée dans ce projet comme barrière de diffusion.

Ce projet propose donc plusieurs idées de barrière de diffusion afin d'améliorer les capacités du substrat de PDMS pour des applications microfluidiques. Ces options seront testées et analysées au niveau de la plateforme microfluidique en PDMS avec micropuits cellulaire intégrant une microélectrode ionique sélective qui a été réalisée au cours de ce projet.

CHAPITRE 3 : ASPECTS THÉORIQUES

Dans ce chapitre, les notions théoriques relatives au projet sont présentées. Le fonctionnement de l'électrode ionique sélective est détaillé ainsi que la technologie utilisée pour la microfabrication de la plateforme dans laquelle ce capteur est intégré. De plus, les propriétés du PDMS sont présentées. Ce chapitre se termine par une brève description de la mort cellulaire.

3.1 Électrode ionique sélective

L'électrode ionique sélective, ou *ISE* (*ion-selective electrode*), est une cellule électrochimique dont le schéma est présenté à la figure 3.1. Ce type d'électrode permet de mesurer les variations de concentration d'un ion cible contenu dans un échantillon, par le biais de la mesure du potentiel électrique (force électromotrice, *fem*). Dans ce projet, l'échantillon est soit une solution de calibration, soit une culture cellulaire.

Le composant clé de l'*ISE* est la membrane ionique sélective (fig. 3.1), car elle contient l'ionophore qui se lie réversiblement à l'ion cible. Cette membrane est aussi formée d'un plastifiant, d'un sel lipophile agissant comme échangeur d'ions et d'une matrice de polymère [20]. En modifiant la composition de cette membrane, en particulier l'ionophore, on peut former une électrode ionique sélective à un ion différent.

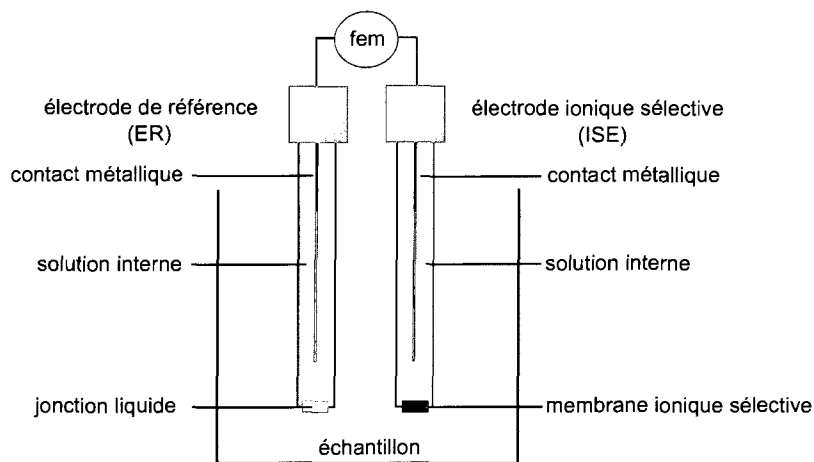
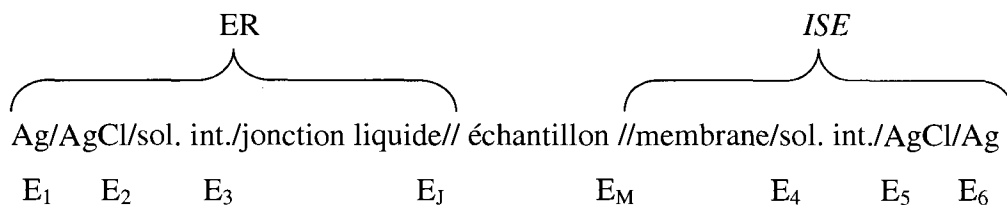


Figure 3.1 : Composants d'une électrode ionique sélective. L'échantillon représente la solution contenant l'ion cible.

L'*ISE* répond à l'activité de l'ion ciblé, dans ce travail le K^+ , et couvre généralement une plage de sensibilité pouvant aller de 1 M à 10^{-6} M. Sa sélectivité à l'ion cible est relative à la constante d'équilibre de la réaction d'échange entre la phase organique (membrane ionique sélective) et aqueuse de l'ion cible et des ions interférents [20].

La force électromotrice (*fem*) à travers la cellule électrochimique de la figure 3.1 est la somme de la contribution de tous les potentiels individuels aux interfaces. Pour illustrer ces contributions, voici un exemple d'une cellule telle que présentée à la figure 3.1, où ER est l'électrode de référence :



Les potentiels E_j et E_i ($i = 1$ à 6) sont indépendants de l'échantillon et peuvent être considérés constants,

$E_{\text{const}} = E_1 + E_2 + E_3 + E_4 + E_5 + E_6 + E_j$ et la fem mesurée peut être simplifiée par l'expression :

$$fem = E_{\text{const}} + E_M \quad (1)$$

Il s'agit donc d'analyser le comportement de E_M , le potentiel à l'interface entre la membrane ionique sélective et l'échantillon, qui est représentatif de l'activité de l'ion cible dans l'échantillon. E_M peut être décrit grâce à des considérations thermodynamiques en assumant que le transfert d'ions à l'interface et que les processus de formation du complexe sont rapides, ce qui assure donc la présence d'un équilibre thermodynamique à l'interface [20].

$$E_M = E^0 + \frac{RT}{nF} \cdot \ln a_{I(aq)} \quad (2)$$

où, E^0 est une constante

$$R = 8,3145 \left[\frac{J}{K \cdot mol} \right] \equiv \text{Constante universelle des gaz}$$

$$T = 298K \equiv \text{Température ambiante}$$

$$F = 9,6485 \cdot 10^4 \left[\frac{C}{mol} \right] \equiv \text{constante de Faraday}$$

$$n \equiv \text{valence de l'ion } (n = 1 \text{ pour } K^+)$$

L'équation 2 est l'équation de Nernst qui établit la relation entre l'activité de l'ion en solution aqueuse, $a_{I(aq)}$, et la force électromotrice mesurée :

$$fem = E_{\text{const}} + E^0 + \frac{RT}{nF} \cdot \ln a_{I(aq)} \quad (3)$$

$$fem = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \cdot \ln a_{I(aq)} \quad (4)$$

$$fem = E^{0'} + \frac{59,1}{n} \cdot \log a_{I(aq)} \quad (5), \text{ où } E^{0'} \text{ est une constante}$$

L'activité ionique se définit comme la déviation du comportement d'une particule de soluté par rapport au comportement idéal théorique, soit la dissociation complète du soluté en ions d'Arrhenius [21]. On l'exprime comme le produit entre la concentration ionique $[I_{(aq)}]$ et le coefficient d'activité $\gamma_{I(aq)}$:

$$a_{I(aq)} = \gamma_{I(aq)} \cdot [I_{(aq)}] \quad (6)$$

Dans ce projet, les coefficients d'activité sont approximés comme étant égal à l'unité pour les solutions utilisées, soit composées de 150mM NaCl et de 0,1 M à 10^{-7} M KCl. Dans les applications de ce travail, puisque c'est l'ion K^+ qui est étudié, l'expression 5 peut s'exprimer comme :

$$fem = E^0 + 59,1 \cdot \log ([K^+]) \quad (7)$$

La figure 3.2 montre l'allure d'une courbe de réponse Nernstienne théorique et présente la notion de limite de détection de l'ISE, qui détermine la concentration minimale de l'ion cible pour laquelle la réponse est de type Nernstienne.

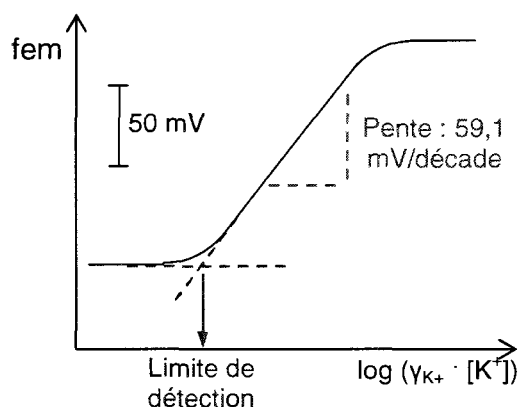


Figure 3.2 : Courbe théorique de la fem mesurée en fonction du logarithme de l'activité ionique de K^+ , où la pente est représentative de la loi de Nernst.

3.2 Propriétés du polydimethylsiloxane

Le PDMS est le polymère organosilicié qui a été choisi pour ce projet, en remplacement du silicium [4]. Contrairement au silicium, le PDMS est transparent aux longueurs d'onde du visible, caractéristique indispensable pour l'observation cellulaire avec un microscope inversé. Sa perméabilité au gaz peut également être un atout pour les cultures cellulaires sur puce, puisque le PDMS permet l'échange d'oxygène et de gaz carbonique avec l'air environnant.

Cependant, selon l'application choisie pour le biomicrosystème en PDMS, certaines de ses propriétés peuvent causer des problèmes. Son hydrophobicité peut rendre difficile l'introduction de solutions aqueuses dans les microcanaux. Un traitement de surface par plasma oxygène [22] ou par irradiation UV [23] peut limiter ce problème en rendant plus hydrophile la surface du PDMS. Ces propriétés sont utilisées pour favoriser l'adhésion cellulaire. D'autres traitements de surface peuvent être utilisés à cet effet, telle que le traitement par hydroxyde de sodium [24].

Dans ce travail, on cherche à intégrer une microISE dans une plateforme microfluidique en PDMS. L'interaction entre le solvant de la membrane ionique sélective et le PDMS est un des points cruciaux dans ce problème. Le PDMS peut en effet gonfler et même être dissous en présence de certaines substances organiques [25]. La littérature concernant les interactions entre le PDMS et le cyclohexanone, qui est utilisé dans la composition de la membrane ionique sélective, est assez rare. Chen *et al.* [26] ont montré qu'en augmentant la concentration de cyclohexanone dans du chloroforme, le PDMS a une nette tendance à se dissoudre. Dans notre cas, cette tendance sera encore plus prononcée, car la concentration de cyclohexanone sera très élevée; d'autre part, l'action du cyclohexanone sur le PDMS est prolongée, car son évaporation sera ralentie par son confinement dans des microcanaux. Cet aspect nécessitera donc de protéger le PDMS du cyclohexanone.

3.3 Mort cellulaire

Une cellule mammifère en santé est sensible, entre autres, aux changements ioniques de son environnement et elle réagit pour conserver son équilibre osmotique. Pour comprendre ses réactions, le tableau 3.1 présente les concentrations ioniques typiques de cellules mammifères [27].

Tableau 3.1 : Concentration ionique du K^+ et du Na^+ pour les cellules mammifères.

	$[K^+]$ (mM)	$[Na^+]$ (mM)
Intracellulaire	140	5 – 15
Extracellulaire	5	145

Lorsqu'il y a rupture de la membrane cellulaire et déversement de son contenu dans le milieu environnant, c'est la mort cellulaire par nécrose. La nécrose est caractérisée par une mort passive et accidentelle résultant de perturbations externes. La détection d'une augmentation soudaine et drastique de la concentration d'ions potassium dans le milieu extracellulaire est donc un bon indicateur de nécrose [4].

Les flux potassiques extracellulaires ne donnent pas seulement des informations sur la nécrose. Ils jouent également un rôle d'indicateur dans les autres processus de mort cellulaire [4]. En effet, le flux de potassium à travers les canaux potassiques et la perte de volume de la cellule qui en découle sont des indicateurs précoces de la mort cellulaire. Ce phénomène a été observé chez les embryons de souris par Trimarchi *et al.* [28]. Cette équipe conclut que la mesure non invasive de potassium pathophysiologique pourrait identifier que l'embryon est en processus de mort cellulaire avant même la manifestation d'indices morphologiques ou d'empreintes moléculaires de mort cellulaire [28].

Les flux d'ions potassiques vers le milieu extracellulaire peuvent aussi permettre l'identification du mécanisme de mort cellulaire. En effet, les flux d'ions K^+ peuvent indiquer qu'il y a apoptose, car ils interviennent dans le processus appelé *Apoptotic Volume Decrease (AVD)* [5]. L'apoptose est un mécanisme actif et programmé de désassemblage cellulaire autonome menant à la mort cellulaire, qui ne provoque pas d'inflammation [29], contrairement à la nécrose. L'équipe de Barbiero a déterminé que la concentration intracellulaire de potassium dans une cellule de fibroblaste de souris passe de 140 mM à 50 mM lors de l'apoptose [30]. Ces flux de potassium jouent donc un rôle important sur le contrôle de l'apoptose [31] et s'avèrent indépendants du type cellulaire et du stimulus utilisé pour induire l'apoptose [5].

Jusqu'à récemment, on considérait la mort cellulaire sous le paradigme apoptose/nécrose. Cependant, Fink et Cookson [29] ont démontrés que le spectre biologique réel de la mort cellulaire est beaucoup plus diversifié. En effet, la cellule en santé répond par une variété de voies moléculaires lorsqu'elle est soumise à des stimuli de mort cellulaire. Les voies identifiées à ce jour sont l'apoptose, l'autophagie, l'oncose, la pyroptose et d'autres voies sont en processus d'identification.

Dans ce travail, on s'intéresse aussi à la mort cellulaire par oncose, qui se caractérise par le gonflement de la cellule et des organelles, ainsi que par l'augmentation de la perméabilité de la membrane [29]. Le gonflement de la cellule peut être provoqué en modifiant le milieu extracellulaire afin de le rendre hypotonique, c'est-à-dire que : $[Na^+]_{\text{extracellulaire}} < 145 \text{ mM}$. Dans ce cas, la cellule se gonfle d'eau par osmose. En réaction à cette augmentation de volume, la cellule active son mécanisme de *Regulatory Volume Decrease (RVD)*. Le mécanisme *RVD* s'opère par l'activation de la voie des flux potassiques extracellulaires [5, 32] et il y a une augmentation de la concentration d'ion potassium dans le milieu extracellulaire. Dans ce travail, les flux potassiques seront provoqués par un choc hypoosmotique. Dans les cas où le *RVD* ne parvient pas à rétablir l'équilibre, le choc hypoosmotique peut mener à la nécrose.

CHAPITRE 4 : MÉTHODOLOGIE ET FABRICATION

Ce chapitre regroupe les informations techniques utiles pour la réalisation du projet. Le matériel utilisé, la méthode de fabrication des dispositifs et les différents designs sont présentés en détails. L'instrumentation utilisée, les protocoles expérimentaux ainsi que les montages sont également expliqués.

4.1 Matériel

Cette section présente les composants utilisés pour la fabrication de la membrane ionique sélective, ainsi que ceux nécessaires aux tests de fonctionnalité de l'électrode ionique sélective. On y précise aussi les produits et les protocoles utilisés pour la culture cellulaire.

4.1.1 Membrane ionique sélective et solutions standard

La membrane sélective aux ions K^+ utilisée dans la microélectrode ionique sélective (*microISE*) est composée des éléments suivants :

- Ionophore : Valinomycine (5 %, masse/masse)
- Sel : Potassium tetrakis[3,5-bis(trifluorométhyl)phényl]borate (1 %, m/m)
- Plastifiant : bis (2-éthylhexyl) sebacate (89 %, m/m)
- Matrice : *PVC* (polychlorure de vinyle) (5 %, m/m)

Ces composants, totalisant 200 mg, sont dissous dans du cyclohexanone (420 μ L). Les composants de la membrane et le solvant sont de qualité *selectophore* (*Sigma-Aldrich*).

Le chlorure de sodium et le chlorure de potassium utilisés dans les solutions standard pour la calibration de l'*ISE* et pour les essais cellulaires sont de qualité *puriss p.a.* (*Sigma-Aldrich*). Les solutions de calibration sont préparées avec de l'eau déionisée (résistance spécifique $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) en diluant une solution de $2 \cdot 10^{-1} \text{ M KCl}$ /150 mM NaCl dans une solution de 150 mM NaCl afin d'obtenir des solutions de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} M KCl .

4.1.2 Composants et protocole pour la culture cellulaire

Des fibroblastes d'embryons de souris (*NIH/3T3*, *CRL-1658*, *ATCC*) sont utilisés pour les essais cellulaires, étant donné leur facilité au niveau de la culture. Les cellules sont maintenues dans un milieu de culture *DMEM* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, *AQmedia*, *D0819*, *Sigma*) supplémenté avec 10% de sérum de veau (*No.30-2030*, *ATCC*) et avec 1% de pénicilline/streptomycine (*P7539*, *Sigma*). Les cellules sont cultivées dans des fioles de type *T-flask* de 75cm^2 dotées d'un bouchon perméable à l'air (*CellStar*, *658-175*, *Greiner bio-one*) dans un atmosphère contrôlé à 37°C et 5% CO_2 et sont transférées tous les 2 ou 3 jours. L'inoculation commence à 200 000 cellules/mL et les cellules sont transférées dans une nouvelle flasque avant de devenir confluentes. La concentration cellulaire est déterminée par un hemacytomètre et la viabilité cellulaire est déterminée par la méthode d'exclusion du Trypan bleu.

Le protocole pour les essais de nécrose cellulaire débute par la centrifugation d'environ 2 millions de cellules. Le surnageant est ensuite éliminé et on ajoute quelques millilitres d'une solution de 150 mM NaCl. On refait le processus deux fois afin d'éliminer le *DMEM* (qui contient 4.5 mM de K^+) du milieu extracellulaire. On centrifuge une dernière fois et on récupère l'amas de cellules pour les essais cellulaires.

4.2 Design et méthodes de fabrication

Les paragraphes suivants présentent le design de la plateforme cellulaire microfluidique et les méthodes employées pour sa fabrication. On y explique la microfabrication du substrat et la conception de la microélectrode ionique sélective.

4.2.1 Plateforme cellulaire microfluidique avec microélectrode ionique sélective

La plateforme présentée s'inspire d'un travail récemment réalisé dans le laboratoire BioMEMS de l'École Polytechnique de Montréal au niveau de la plateforme cellulaire en silicium [4]. Étant donné les coûts de production élevés et l'opacité aux longueurs d'ondes du visible des plateformes en Si, on désire les remplacer par des plateformes en plastique. Celles-ci peuvent être fabriquées à faibles coûts, elles sont transparentes et biocompatibles. La plateforme microfluidique présentée dans ce travail est conçue à partir de polydiméthylsiloxane (PDMS) microstructuré par prototypage rapide.

La technique de prototypage rapide permet de concevoir et de fabriquer un système microfluidique en moins d'une journée [6]. C'est une technique pour fabriquer des prototypes rapidement et de manière très économique en comparaison aux techniques de microfabrication traditionnelles utilisant le silicium et le verre. Le prototypage rapide consiste en la fabrication d'un moule microstructuré sur lequel un élastomère comme le PDMS est moulé. Le PDMS sous forme liquide se conforme parfaitement au moule et peut créer des dispositifs microfluidiques avec une précision de l'ordre du micromètre.

Dans ce travail, le moule est fait de photorésine épaisse (65µm, *SU8-50*, *epoxy*, *Microchem*), déposée sur une gaufre de Si (Ø4''), microstructurée par photolithographie (réalisé au Laboratoire de MicroFabrication, LMF, École Polytechnique de Montréal). Le design du masque utilisé pour la photolithographie et le détail de la microfabrication du moule en Si et en résine (*SU8-50*) sont présentés en annexe. La photolithographie est

effectuée à l'aide de masques souples et transparents sur lesquels les motifs du réseau microfluidique sont imprimés avec une haute résolution. Dans le cadre de ce projet, la photorésine forme des structures 3D permanentes d'une largeur de 50µm et d'une hauteur de 65µm. Cette photorésine permet de créer un micromoule en un minimum d'étapes dont les côtés sont parfaitement verticaux, ce qui facilite le démoulage et permet de réutiliser le moule plusieurs fois.

Une fois le moule en Si/SU8-50 réalisé, sa surface est modifiée par une silanisation en phase vapeur grâce à l'agent $\text{C}_8\text{H}_4\text{Cl}_3\text{F}_{13}\text{Si}$ ((Tridecafluoro-1,2,2-tetrahydrooctyl)-1-trichlorosilane, *United Chemical Technologies*), ce qui rend la surface du moule hydrophobe et facilite le démoulage du PDMS une fois polymérisé [6]. Pour ce faire, on évapore cet agent dans un cristalliseur fermé à 70°C pour 12 heures afin qu'il se dépose uniformément sur le moule.

Pour la réalisation des dispositifs en PDMS, on mélange les deux composants du *Sylgard 184 elastomer kit* (*Dow Corning*), dans une proportion de 10/1 (base/durcisseur, volume/volume). Afin d'obtenir des dispositifs d'environ 300µm d'épaisseur, on incorpore 3,3 mL de PDMS sur le moule placé dans un pétri de plastique (8cm x 8cm). On élimine les bulles en plaçant le tout sous une cloche à vide pendant 1 heure. Finalement, le PDMS est polymérisé à 60°C pendant 4 heures sur une plaque chauffante mise à niveau.

Une fois la polymérisation complétée, on utilise un scalpel pour découper les différents dispositifs et on procède au démoulage. La figure 4.1 montre une vue en coupe du dispositif. Les puits (réservoirs) destinés à la membrane ionique sélective (~ 250nL) et à la culture cellulaire (~ 250nL) sont créés par deux trous (Ø1 mm) réalisés à l'aide d'un poinçon destiné aux biopsies cutanées (*Dermal Biopsy punch, Miltex inc.*). Les deux puits doivent être distancés d'au moins 5mm pour éviter que la membrane ionique sélective contamine le puits cellulaire en cas de débordement de la membrane ionique

sélective. Cette distance entre les deux puits est aussi nécessaire afin de garantir une distance minimale entre les connecteurs microfluidiques externes. Le PDMS est ensuite lavé dans un bain à ultrasons avec de l'isopropanol, de l'eau déionisée et puis finalement séché au jet d'azote. Le PDMS peut finalement être collé sur un support en verre, sans distorsion des microstructures [33].

Dans ce projet, le canal formé dans le PDMS est aligné et posé sur un morceau de verre sur lequel des micropistes de platine sont structurées par un procédé *lift-off*. Ce procédé est réalisé de la manière suivante : une couche de photorésine est microstructurée sur une gaufre de verre de ($\varnothing 4''$), de manière à ce que la surface où l'on désire du métal soit totalement découverte. On dépose ensuite le métal par évaporation induite par un faisceau d'électrons. On dépose d'abord une couche de titane de 30 nm, suivie d'une couche de platine de 120 nm d'épaisseur. La couche de Ti est utilisée comme couche d'adhérence sur le verre. Finalement, on dissout la photorésine, ce qui enlève le métal non désiré et laisse intactes les micropistes déposées sur le verre. Les micropistes de Pt utilisées ont été fabriquées dans les laboratoires de l'Université de Sherbrooke (CRN2).

On dépose le dispositif de PDMS sur le verre en alignant le microcanal de 50 μ m de largeur sur une piste de Pt ($\sim 80\mu$ m de largeur) de manière à ce que le réservoir de membrane ionique sélective (puits *ISE*) soit en contact avec le Pt, mais que le puits cellulaire n'y touche pas (Fig. 4.1). Cet alignement se fait à l'aide d'un stéréoscope (*Olympus, SZX16*). Il est aussi possible d'établir un lien permanent entre le PDMS/verre. Le PDMS traité au plasma oxygène possède des groupes (Si-OH) à sa surface, tandis que le verre traité au plasma oxygène présente des groupements (-OH) à sa surface. Des liaisons covalentes se forment entre les deux par condensation lorsque le verre est mis en contact avec le PDMS.

Une goutte de membrane ionique sélective est introduite dans le réservoir et elle parcourt le microcanal par capillarité, pour se rendre jusqu'au puits cellulaire. L'évaporation du cyclohexanone contenu dans la membrane nécessite 48 heures. Par la suite, le verre est collé sur un circuit imprimé, où les connexions avec les pistes de Pt sont réalisées avec une colle conductrice (*Epoxy technology, EE129-4, Epo-Tek*).

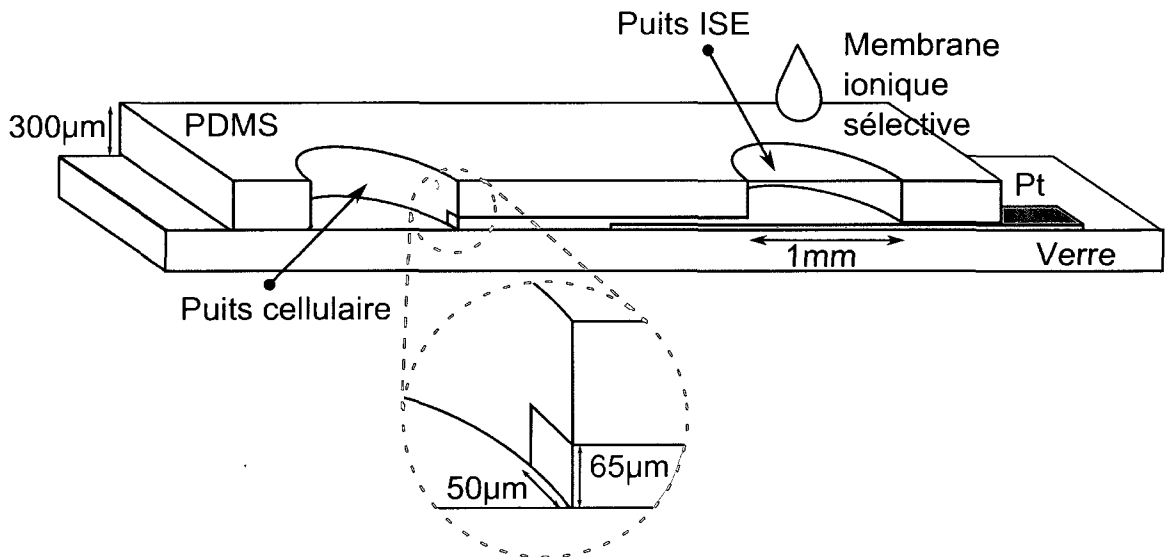


Figure 4. 1 : Vue en coupe du dispositif (non à l'échelle). La membrane ionique sélective prend la forme du microcanal et expose une surface (50 µm x 65 µm) à la solution physiologique présente dans le puits cellulaire. Du côté opposé, la membrane ionique sélective est en contact avec l'électrode interne de Pt.

Le microcanal qui contient la membrane ionique sélective permet premièrement de définir et de miniaturiser précisément la surface active de l'électrode (surface en contact avec la solution physiologique dans le puits cellulaire $50\mu\text{m} \times 65\mu\text{m}$) et deuxièmement d'ancrer solidement la membrane dans le dispositif. Contrairement aux membranes ioniques sélectives planaires [11], les membranes ainsi ancrées ne présentent pas de problème d'adhésion et ont un temps de vie prolongé [34]. De plus, ce design minimise la surface de contact entre la membrane ionique sélective et le milieu cellulaire, réduisant ainsi les effets toxiques du PVC contenu dans la membrane ionique sélective.

Pour les premières phases du projet, un prototype simplifié a préalablement été réalisé dans le but de vérifier que le concept d'intégration d'une électrode ionique sélective dans un polymère est réalisable. La figure 4.2 montre le prototype utilisé pour valider cette hypothèse, appelé macroélectrode ionique sélective (*macroISE*). Un morceau de PDMS est posé sur une gaufre de silicium recouverte d'une couche de platine. Un trou est perforé dans le PDMS et est rempli de membrane ionique sélective.

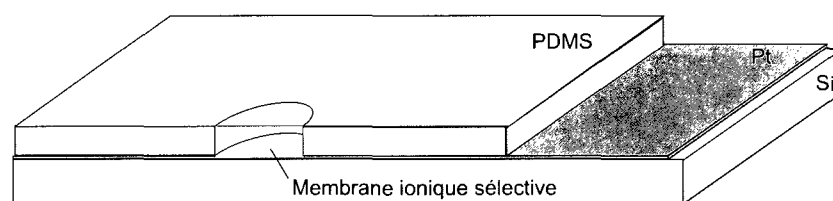


Figure 4. 2 : Plateforme en PDMS intégrant une *macroISE* ($\varnothing 2\text{mm}$).

4.2.2 Barrière de diffusion

Un sérieux problème anticipé lors de ce projet est que le cyclohexanone, utilisé comme solvant dans la membrane ionique sélective, endommage le substrat de PDMS [26] et provoque une dégradation des performances du capteur (section 3.2). Une barrière de diffusion entre le PDMS et la membrane ionique sélective est une solution possible afin de bloquer la diffusion du cyclohexanone dans le PDMS. Suite à l'analyse des différentes solutions proposées à la section 2.3, quatre méthodes sont évaluées pour cette barrière de diffusion :

1. Dépôt de SiO_2 par *PECVD*
2. Dépôt de Parylène
3. Dépôt *Sol-gel*
4. Traitement aux UV/O_3

Une couche de 150 nm de SiO_2 est déposée sur le PDMS par *plasma-enhanced chemical vapour deposition* (*PECVD*, Luke MacQueen, Laboratoire de Procédé par Plasma) à l'aide du montage présenté à la figure 4.3 [35]. Il s'agit d'un réacteur *RF-PECVD* de type *Reinberg* à plaques parallèles opérant à 13.56 MHz. La couche de SiO_2 d'environ 150 nm est formée en 2 minutes grâce à un mélange de gaz $\text{N}_2\text{O}:\text{SiH}_4$ (Rapport des débits respectifs, 10:1). Les échantillons sont placés sur l'électrode du bas connectée à la terre pour minimiser l'effet néfaste du bombardement ionique. Ce bombardement d'ions énergétiques peut augmenter localement la température, mais permet aussi d'obtenir une meilleure densité et d'améliorer les propriétés électriques et mécaniques de la couche mince. Une température ambiante est souhaitable lors du dépôt afin de minimiser la contrainte en compression dans la couche mince lors du refroidissement [35]. Cependant, lorsque le plasma est activé, on remarque toujours une augmentation de la température (T) dans l'enceinte de $33^\circ\text{C} \leq T \leq 44^\circ\text{C}$. La puissance *RF* est maintenue à 50 W. L'épaisseur de la couche de SiO_2 formée sur le PDMS est évaluée par

ellipsométrie (*JA Woollam & co.*). De plus, on mesure l'indice de réfraction de la couche mince afin de vérifier que sa composition s'apparente au SiO_2 , ayant un indice de $n(@587.6 \text{ nm}) \approx 1,46$.

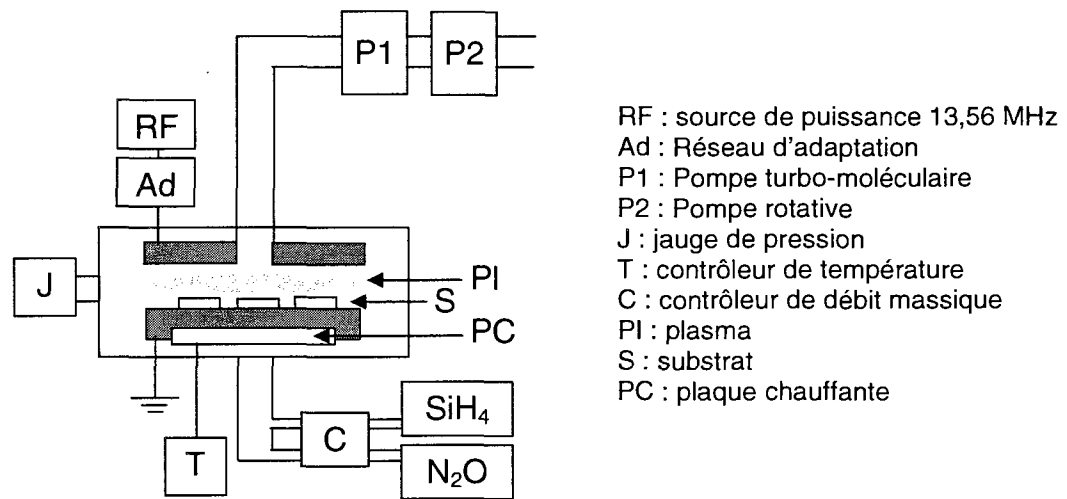


Figure 4. 3 : Montage expérimental du réacteur *RF-PECVD* [35]

Une couche de $1\mu\text{m}$ de Parylène a été testée comme alternative à la couche mince de SiO_2 dans le but de créer une barrière de diffusion entre la membrane ionique sélective et le PDMS. Le Parylène est déposée sur le substrat de PDMS à température ambiante (LMF, *Speciality coating system labcoater 2*, *Parylene C*). Les spécifications du procédé de dépôt sont présentées à la figure 4.4. En résumé, le dimère solide est amené en phase gazeuse, clivé en monomères et finalement, polymériser spontanément sur le substrat.

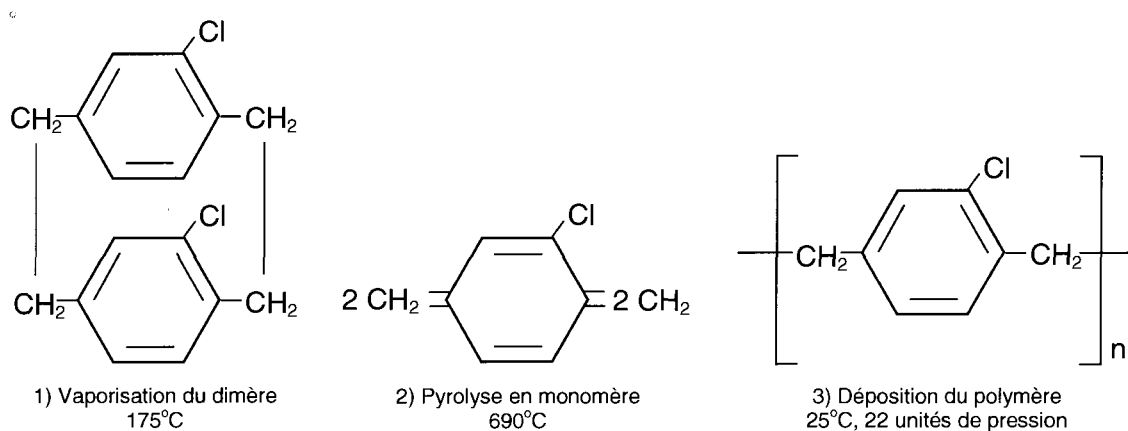


Figure 4. 4 : Dépôt de Parylène (Appareil *Speciality coating system labcoater 2* du LMF).

L'intégrité mécanique des couches de Parylène et de SiO_2 est examinée par microscopie électronique à balayage (*MEB-Hitachi S-4700*, LASEM).

Il est aussi possible de créer une barrière de diffusion en SiO_2 à la surface du PDMS par un procédé *sol-gel*, qui consiste en l'hydrolyse et la condensation d'un composant alcoxylé dans le polymère [15], ce qui conduit à la gélification du système. Les étapes du traitement sont les suivantes :

- 5 h. dans le four à 95°C et refroidissement jusqu'à la température pièce
- 4 min. dans le tetraethyl orthosilicate (*TEOS*) pur
- 15 h. dans 2.8% (éthylamine/EDI, v/v) et rinçage 1 min. à EDI (eau déionisée)
- 1 h. dans le four à 95°C et refroidissement jusqu'à la température pièce
- 2 h. dans une solution basique de phosphate de $\text{pH} = 7,8$
- Rinçage à EDI et séchage à l'azote

Une barrière de diffusion a également été créée sur le PDMS par un traitement UV/ O_3 de 5 heures réalisé à l'aide de l'ozoniseur du LMF (longueur d'onde de 254 nm).

La qualité de chaque barrière est caractérisée par l'évaluation de la sensibilité des électrodes ioniques sélectives au K^+ incorporées au PDMS recouvert d'une barrière, ainsi que par l'observation de sa surface par microscopie optique.

4.3 Instrumentation, montages expérimentaux et protocoles

La section suivante présente tous les éléments nécessaires à l'enregistrement d'une différence de potentiel (DDP) induite par un changement de concentration d'ion potassium détectée par la microélectrode ionique sélective.

4.3.1 Mesures potentiométriques

Le montage utilisé pour la validation préliminaire du concept d'intégration d'une électrode ionique sélective au PDMS est présenté à la figure 4.5. On y retrouve le prototype simplifié de la macroISE (fig. 4.2) assemblé avec la chambre fluïdique. Cette chambre fluïdique (volume de 18 μL) permet de diriger le flux de solution pompée dans la chambre afin que chaque solution entre en contact avec la membrane ionique sélective. La chambre fluïdique intègre la miniélectrode de référence (*mini-Ag/AgCl/3 M KCl DRIEF-2, World precision instruments*), placée à la sortie du flux (fig. 4.5). Les mesures potentiométriques sont enregistrées à l'aide d'un amplificateur à haute impédance d'entrée, connecté au Pt et à l'électrode de référence. Le système d'acquisition de données est contrôlé par *Labview* [34]. Les composants du montage, à l'exception de la pompe et de l'ordinateur, sont placés dans une cage Faraday afin d'éviter les perturbations externes de la fem (force électromotrice) enregistrée [4].

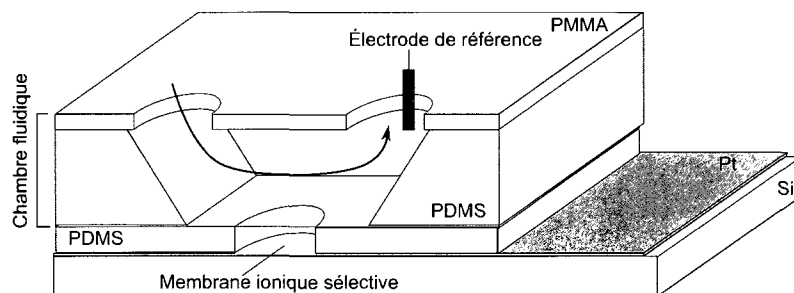


Figure 4. 5 : Montage expérimental pour essais électrochimiques avec la plateforme microfluidique en PDMS avec une macroISE.

La fonctionnalité des *ISE* est testée par une calibration électrochimique réalisée avec des solutions standard de concentration ascendante, allant de 10^{-7} M K^{+} , 10^{-6} M K^{+} , ..., 10^{-2} M K^{+} jusqu'à 2×10^{-1} M K^{+} . Ces solutions de calibration sont amenées dans la chambre fluide par une pompe Masterflex (*Cole Palmer Instrument*) à un débit de $22 \mu\text{L/s}$. La calibration électrochimique s'effectue selon les étapes suivantes :

- 1) Solution de 10^{-7} M KCl/150mM NaCl pompée pendant 5min. et ensuite maintenue statiquement dans la chambre fluide pour 15min. Ceci permet de stabiliser la réponse potentiométrique de l'*ISE* pour les faibles concentrations de potassium.
- 2) Solution de 10^{-7} M KCl/150mM NaCl pompée pour 2min., suivi d'une pause statique de 2min. et finalement ensuite d'un enregistrement de la fem échantillonnée toutes les 0,01 secondes lors des 20 dernières secondes.
- 3) Solution de 10^{-6} M KCl/150mM NaCl pompée pour 2min., suivi d'une pause de 2min. et finalement d'un enregistrement de la fem échantillonnée toutes les 0,01 secondes lors des 20 dernières secondes.
- 4) Reprise du cycle de pompage, repos statique et enregistrement pour la prochaine solution, jusqu'à 2×10^{-1} M KCl/150mM NaCl.

L'enregistrement de la fem se fait au même moment du cycle pour chacune des solutions, ce qui permet d'établir une courbe de la force électromotrice en fonction de la concentration, où chaque point représente la moyenne de la fem enregistrée pendant 20s.

Le montage utilisé pour la calibration d'une microélectrode ionique sélective intégrée au PDMS est présenté à la figure 4.6. On y retrouve la microISE de la figure 4.1 avec la chambre fluidique. Tous les tests sont effectués de la même manière qu'avec le dispositif incorporant la macroISE.

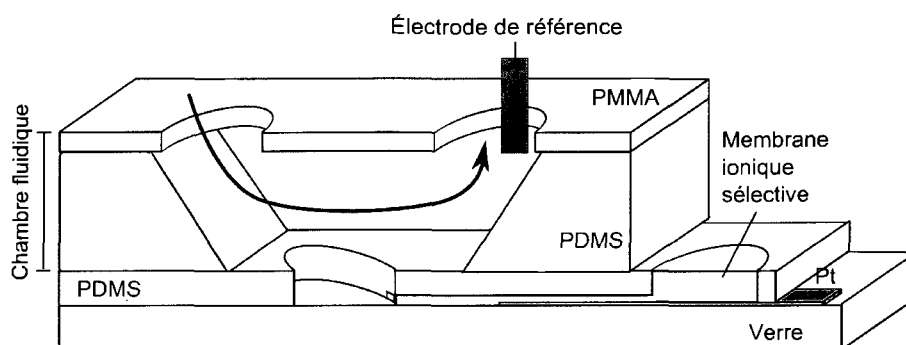


Figure 4. 6 : Montage expérimental pour essais électrochimiques avec la plateforme microfluidique en PDMS avec une microISE.

4.3.2 Protocole des essais cellulaires

Les cellules sont transférées dans le puits cellulaire de 250nL et une membrane poreuse est placée par-dessus de manière à le séparer de la chambre fluïdique et à confiner les cellules suspendues. La figure 4.7 présente ce montage pour les plateformes intégrant une macroISE (fig. 4.7 a) et une microISE (fig. 4.7 b). La membrane microporeuse (*Falcon, 1 μm pore size, PET membrane, #353102*) permet la diffusion des ions.

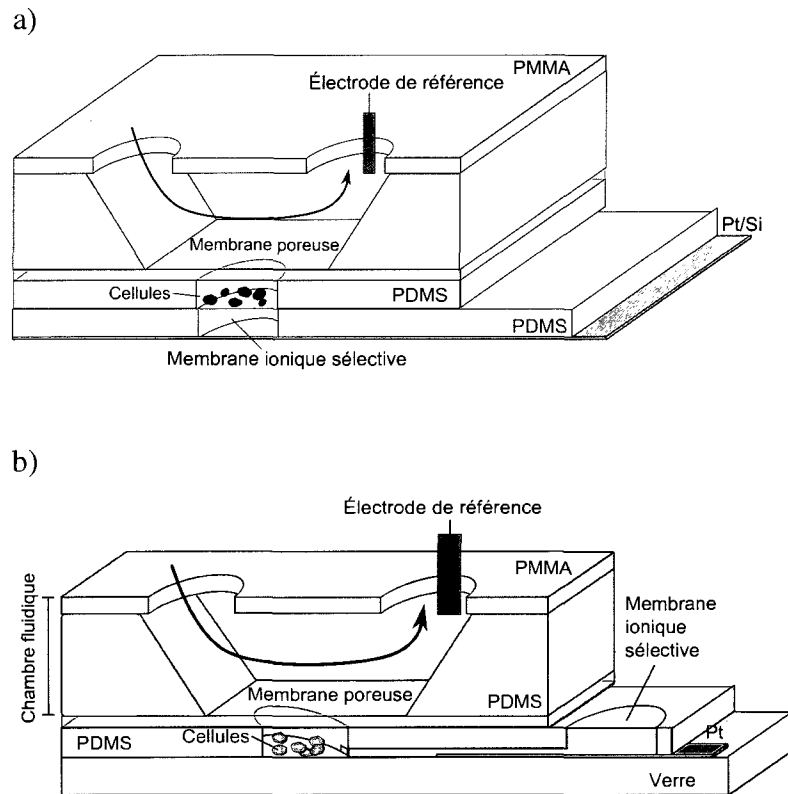


Figure 4. 7 : Montage expérimental pour essais cellulaires avec les plateformes cellulaires microfluidique en PDMS avec a) macroISE et b) microISE.

La reproductibilité des mesures est assurée par l'automatisation partielle des mesures par un protocole précis :

- 1) Stabilisation de quelques minutes de l'électrode ionique sélective dans la solution de 150mM NaCl.
- 2) Pompage d'eau déionisée (EDI) pendant 1 min à 22 μ L/s, ce qui provoque la mort cellulaire. Attendre la stabilisation de la force électromotrice (environ 10min.).
- 3) Pompage d'une solution de 150mM NaCl afin d'éliminer le potassium du puits cellulaire et de la chambre fluidique (Rinçage).
- 4) Une fois l'équilibre atteint, on procède à une calibration de l'électrode ionique sélective telle que décrite à la section 4.3.1.

Lors de l'étape 2), le NaCl du puits cellulaire (250 nL) diffuse rapidement vers la chambre fluidique (18 μ L) remplie d'EDI, étant donné leur différence de volume. Il y a donc une diminution importante et soudaine de l'osmolarité extracellulaire, ce qui induit un choc hypoosmotique. Le milieu hypoosmotique est maintenu pendant environ 10 min. Les essais témoin (sans cellule) sont réalisés selon les mêmes étapes.

CHAPITRE 5 : RÉSULTATS ET ANALYSE

Dans ce chapitre, les principaux résultats obtenus au cours du projet sont présentés. Les phénomènes observés sont analysés et des solutions aux problèmes sont proposées. Cette section débute par l'intégration d'une électrode ionique sélective dans une plateforme microfluidique de PDMS. On analyse ensuite les différentes barrières de diffusion et les résultats obtenus au niveau de la miniaturisation de l'électrode ionique sélective (*ISE*) dans le but d'intégrer une micro*ISE* au dispositif de PDMS. Les résultats sont comparés avec ceux obtenus précédemment avec la plateforme en silicium [4].

5.1 Électrode ionique sélective intégrée dans le PDMS

Premièrement, on vérifie le concept d'intégration d'une électrode ionique sélective dans le PDMS à l'aide du montage présenté à la figure 4.5 (macro*ISE*). La sensibilité de l'électrode ionique sélective en fonction de son vieillissement est présentée à la figure 5.1. Au début de son utilisation (jour 1 et 4), la sensibilité est quasi-Nernstienne. Cependant, contrairement aux microélectrodes de Si [34], l'*ISE* intégrée au PDMS a un temps de vie inférieur à une semaine et se dégrade rapidement.

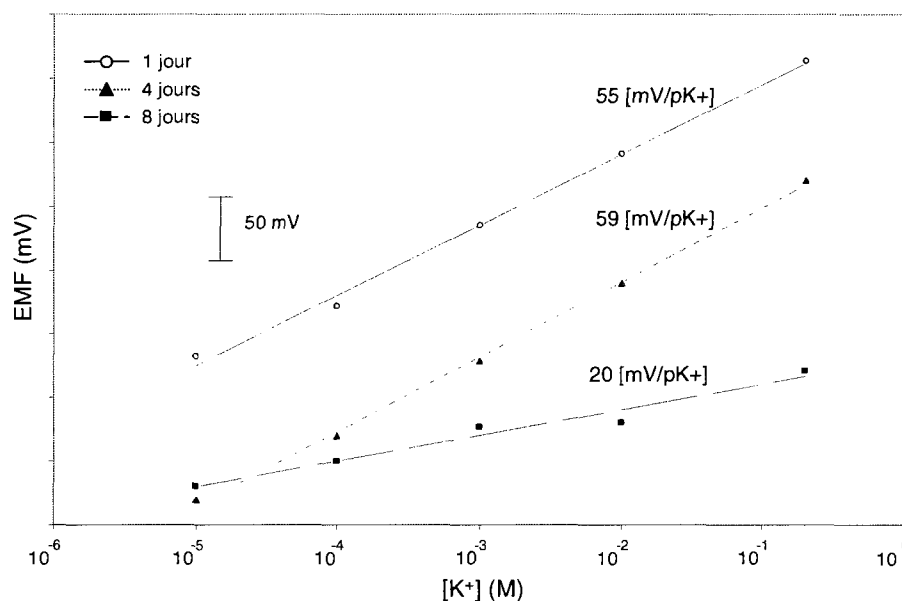


Figure 5. 1 : Courbe de calibration d'une électrode ionique sélective incorporée dans le PDMS. La force électromotrice (*EMF*, *electromotrice force*) en fonction de la concentration en ions potassium ($[K^+]$, échelle logarithmique) est mesurée directement après le séchage de la membrane ionique sélective (jour 1), après 4, puis 8 jours.

La dégradation observée est due en particulier au cyclohexanone, composant utilisé afin de solubiliser la membrane ionique sélective. En effet, le PDMS peut se gonfler et même être dissous en présence de certaines substances organiques [25] (section 3.2). Ces perturbations au niveau du PDMS fragilisent l'adhésion entre la membrane ionique sélective et le PDMS, ce qui peut provoquer l'apparition de courts-circuits entre l'échantillon (solution aqueuse) et le Pt.

Tableau 5.1 : Solvatation d'un bloc de PDMS (15mm x 5mm x 5mm) immergé dans le cyclohexanone.

	Temps (h)	Masse du PDMS (mg)
Immersion	0	297
	23	380
Évaporation	0	380
	20	292

Le tableau 5.1 présente une analyse succincte de la solvatation du cyclohexanone dans le PDMS (précision de la balance de 10^{-4} g). Immergé dans une solution de cyclohexanone, le PDMS subit une augmentation de 28% de sa masse en 23 heures. Ce gonflement s'accompagne bien sûr d'une déformation du polymère. En retirant le bloc de PDMS du cyclohexanone, celui-ci reprend quasiment son poids initial après 20 heures d'évaporation. La différence entre le poids initial et le poids final (-2%) peut être due à une différence d'humidité ambiante entre le début et la fin de l'expérience ou par la dissolution partielle des contaminants par le cyclohexanone [25]. Un résultat similaire avait été obtenu par l'équipe de Roman *et al.* pour des analyses électrophorétiques [13] effectuées dans des microcanaux de PDMS.

Ces résultats confirment que le cyclohexanone endommage le substrat de PDMS [26] et qu'il peut causer la dégradation prématurée des performances du capteur. Deux options permettraient de résoudre ce problème, soit l'échange du cyclohexanone pour un autre solvant ou la création d'une barrière de diffusion. Le tétrahydrofurane (THF) est souvent utilisé pour les membranes ioniques sélectives, mais il dissout tout autant le PDMS que le cyclohexanone. D'autres solvants ne sont pas pris en compte, car il faudrait redéfinir la composition de la membrane. Le choix de la barrière de diffusion s'impose afin de bloquer la diffusion du cyclohexanone dans le PDMS. Les différentes solutions envisagées sont présentées à la section suivante.

5.2 Barrière de diffusion

Le choix du type de barrière permettant de protéger le PDMS doit tenir compte de plusieurs caractéristiques spécifiques de la plateforme. La barrière doit (i) résister chimiquement à tous les composants de la membrane ionique sélective, (ii) doit avoir une grande résistivité électrique, (iii) doit être transparente et (iv) ne doit pas interférer d'aucune manière avec l'électrode ionique sélective.

5.2.1 Procédé *sol-gel* et traitement du PDMS

La solution qui semble la plus rapide et la plus efficace est le procédé *sol-gel* [15], qui consiste en l'hydrolyse de groupements alcoxylés, puis à la condensation des produits hydrolysés, conduisant à la gélification du système [13, 15, 36]. Cette méthode combine la facilité de fabrication de la lithographie souple avec la robustesse chimique du verre [16]. Cette technique fonctionne bien pour la séparation électrophorétique [13]. Dans notre cas, le procédé *sol-gel* a déformé le substrat en PDMS très probablement par la contrainte inhérente à la couche de SiO_2 créée par le procédé *sol-gel*. Par ce fait, les dispositifs réalisés n'ont pu être assemblés, ni être testés.

L'autre solution la plus rapide pour former une bonne barrière de diffusion est le traitement du PDMS par UV/O_3 , qui est souvent utilisé afin de favoriser l'attachement cellulaire. Ce traitement crée une couche semblable au SiO_2 à la surface du PDMS [17, 18]. La figure 5.2 montre les courbes de calibrations obtenues avec le dispositif de la figure 4.5, où la surface structurée du PDMS a été traitée aux UV/O_3 .

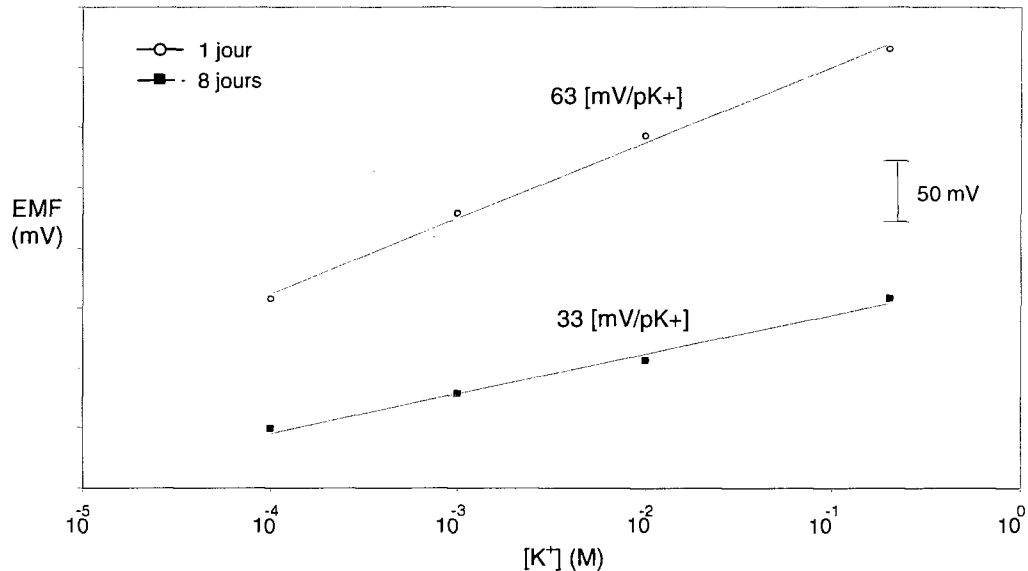


Figure 5. 2 : Courbe de calibration d'une électrode ionique sélective incorporée au PDMS traité aux UV/O₃. La force électromotrice (*EMF*) en fonction de la concentration en ions potassium ($[K^+]$) est mesurée après le séchage de la membrane ionique sélective (jour 1) et après 8 jours.

Ces résultats expérimentaux montrent un vieillissement prématuré du capteur, puisque les valeurs de la variation de la *EMF* mesurée en fonction de la concentration K^+ diminuent avec le temps. La dégradation semble toutefois être moins importante que pour le PDMS seul, puisque la sensibilité après 8 jours est encore de 33mV/pK⁺ alors qu'elle n'était que de 20 mV/pK⁺ pour le PDMS seul.

5.2.2 Dépôt de SiO₂ par *PECVD* sur le PDMS

Étant donné que le procédé *sol-gel* et le traitement par UV/O₃ ne semblent pas idéaux pour ce projet, le choix de la barrière se tourne vers le dépôt d'une couche mince de SiO₂ par *PECVD*. Le but est donc de déposer une couche mince de SiO₂ sur un substrat de PDMS préalablement microstructuré, ce qui s'avère beaucoup moins dispendieux et plus rapide que de microstructurer directement le verre. L'épaisseur de la couche mince déposée sur le PDMS n'a pas une importance critique, en autant qu'elle forme une

bonne barrière de diffusion. L'épaisseur des couches déposées par *PECVD* est donc fixée à une centaine de nanomètres. Le paramètre le plus important est la température de dépôt, qui doit être près de la température ambiante. Les raisons de ce choix découlent des propriétés physiques des matériaux, présentées au tableau 5.2. Ces données permettent une comparaison qualitative des propriétés physiques des deux matériaux et mettent en évidence leurs différences.

Tableau 5.2 : Propriétés physiques du PDMS et du SiO₂.

	Module de Young (MPa)	Coeff. de Poisson	Coeff. linéaire d'expansion thermique ($\cdot 10^{-6}/^{\circ}\text{C}$)	Résistivité volumique ($\cdot 10^{14}$ ohm-cm)
PDMS	0,36 – 0,87	0,5	310*	1,2*
SiO ₂	(46 – 92) $\cdot 10^3$	0,25	0,35 – 0,4	10

[37-40], *D'après la documentation de Dow Corning

Au tableau 5.2, on remarque d'abord la grande différence entre les coefficients linéaires d'expansion thermique. Un dépôt de SiO₂ sur PDMS à une température trop élevée engendre une contrainte en compression dans la couche mince lors du refroidissement. Cette contrainte peut engendrer des craquements observés dans la couche mince de SiO₂ [17]. Pour créer une barrière de SiO₂ efficace, il est important de contrôler la température de dépôt afin qu'elle demeure le plus près possible de la température ambiante, soit environ 25°C.

D'autre part, le tableau 5.2 révèle également une différence importante des modules de Young des deux matériaux. Cette différence d'élasticité peut être problématique lors de la manipulation du dispositif. Le PDMS se déforme facilement lorsqu'on le manipule, contrairement au SiO₂. Si la contrainte mécanique induite par les déformations du PDMS est importante, la couche mince de SiO₂ peut craquer. Pour conserver l'intégrité de la barrière de SiO₂, il faut éviter de contraindre mécaniquement le dispositif.

En résumé, le dépôt par *PECVD* a été optimisé pour une température moyenne aussi proche que possible de la température ambiante et ayant une épaisseur de l'ordre de la centaine de nanomètre. La figure 5.3 présente un dépôt de SiO_2 réalisé à une température de 85°C (T_d).

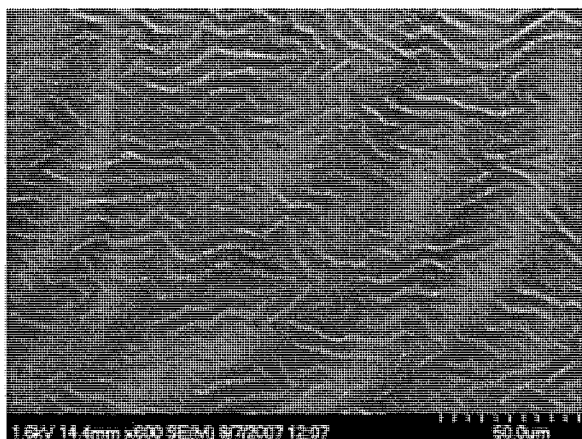


Figure 5. 3 : Image MEB de la surface du SiO_2 (115nm, $n=1,47$) déposé par *PECVD* sur du PDMS ($T_d=85^\circ\text{C}$).

Les ondulations sont le résultat de la relaxation du dispositif face aux contraintes imposées par le PDMS qui rétrécit beaucoup plus que le SiO_2 lors du retour du système à la température ambiante [17, 41]. Le relief onduleux témoigne de la différence entre les coefficients d'expansion thermique des matériaux et du fait qu'il y a une bonne adhérence à leur interface.

Les images de la figure 5.4 ont été obtenues par microscopie optique. La figure 5.4 a) présente une image du dispositif avec une couche de 175nm de SiO_2 n'ayant pas subi de contrainte mécanique après le dépôt. La figure 5.4 b) montre ce même dispositif une fois qu'il a subi une manipulation mécanique consistant à le retirer du porte-échantillon et le déplacer sur l'électrode de Pt.

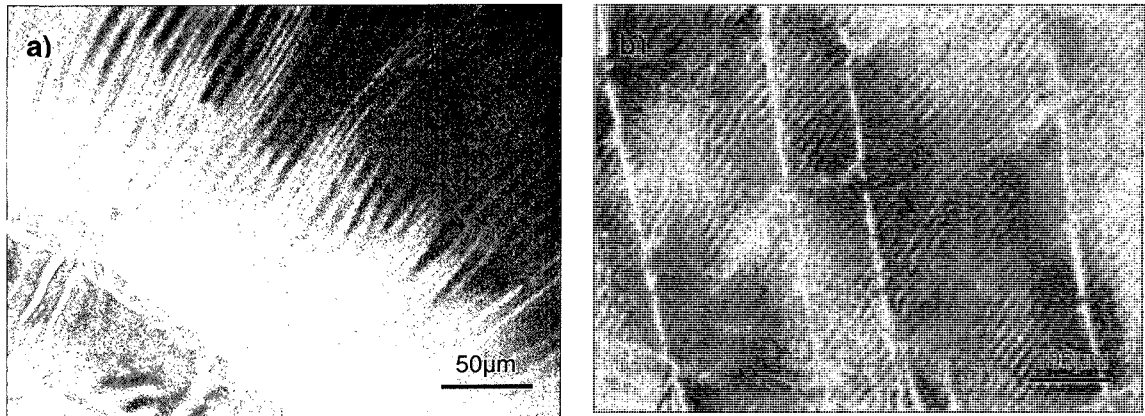


Figure 5. 4 : Surface du SiO_2 déposé par *PECVD* sur du PDMS ($T_d = 37^\circ\text{C}$) :

a) avant manipulations et b) après manipulations

Des motifs onduleux semblables à ceux observés à la figure 5.3 apparaissent à la surface. La figure 5.4 permet de constater que la manipulation du dispositif, aussi minutieuse soit-elle, cause une perturbation mécanique dans le SiO_2 et crée des craquements (figure 5.4 b). Ce phénomène est typique d'une couche rigide déposée sur un substrat flexible [23].

Il faut noter que même en l'absence de chauffage, d'une ou des deux électrodes du réacteur, la température à l'intérieur du réacteur augmente lors d'un dépôt. Ceci est dû à l'activation du plasma. La température minimale mesurée lors du dépôt PECVD est de 33°C et la figure 5.6 présente l'image de la couche mince obtenue dans ce cas.

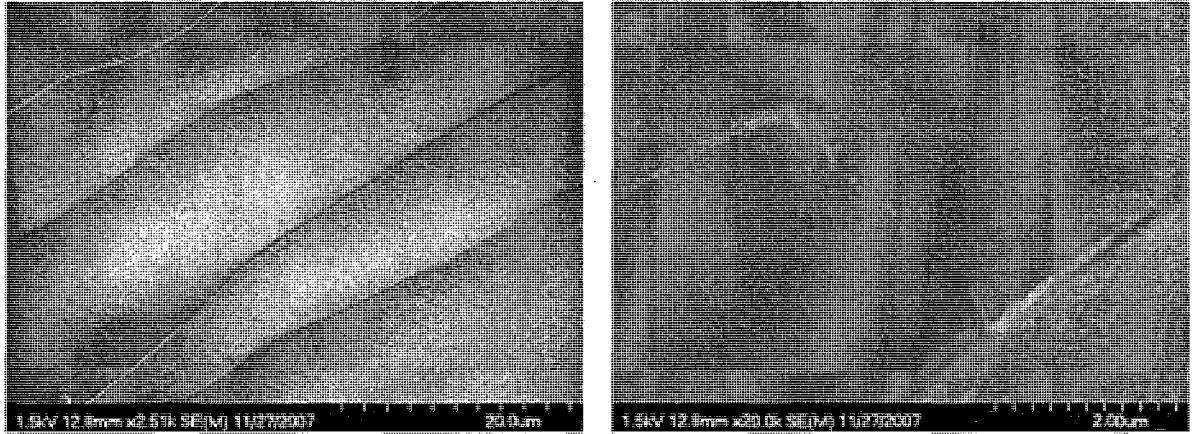


Figure 5. 5 : Images MEB du SiO_2 (173nm, $n=1,43$) déposé par *PECVD* sur du PDMS ($T_d = 33^\circ\text{C}$).

À petite échelle, on distingue à nouveau les craquements liés à la manipulation du dispositif. On peut donc déduire des résultats obtenus à la figure 5.5 que la température de dépôt peut être réduite de manière significative afin d'éliminer la contrainte induite par la différence des coefficients de dilatation thermique, mais que la manipulation mécanique demeure toujours problématique.

Afin de diminuer la contrainte mécanique dû à la manipulation des dispositifs, un dépôt est effectué en parallèle sur deux substrats en PDMS d'épaisseur différentes. Après le dépôt, les deux dispositifs ont subi les mêmes manipulations mécaniques. Le dispositif de faible épaisseur ($d_{PDMS}=200\mu\text{m}$) est demeuré intact, alors que le plus épais ($d_{PDMS}=1,7\text{mm}$) est craquelé (figure 5.6).

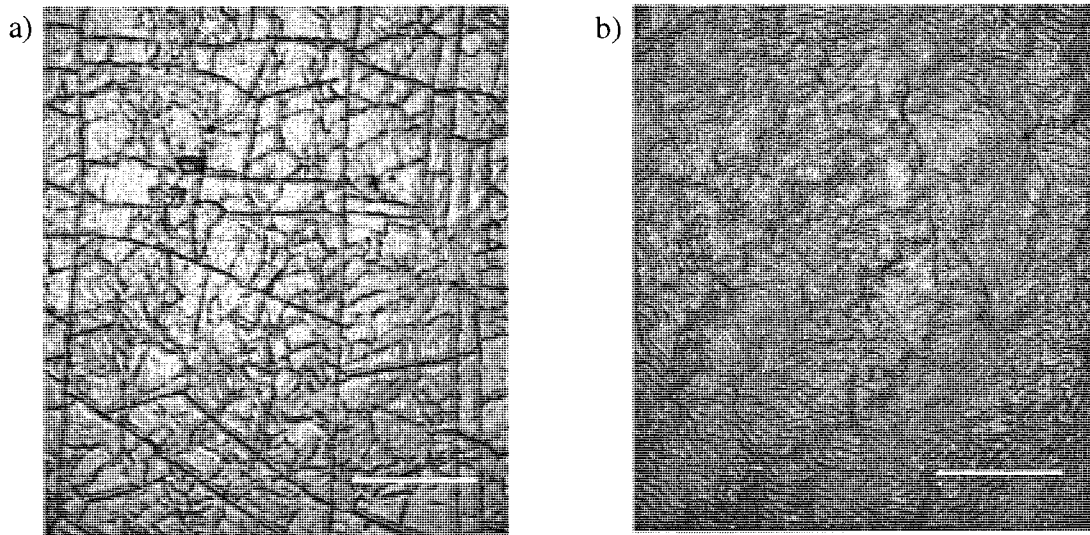


Figure 5. 6 : Image du SiO_2 ($d_{\text{SiO}_2}=116\text{nm}$, $n=1,46$) déposé par *PECVD* sur du PDMS, échelle de $100\mu\text{m}$, ($T_d = 85^\circ\text{C}$).

Épaisseur du PDMS est : a) $1,7\text{mm}$ et b) $200\mu\text{m}$

Ce résultat peut être expliqué par la formule de Stoney, en tenant compte des conditions présentées dans l'article de Huang *et al.* [42], c'est-à-dire : l'épaisseur de la couche mince et du substrat sont faibles par rapport aux dimensions latérales, la couche mince est beaucoup plus mince que le substrat, le substrat est homogène, isotropique et linéairement élastique et la couche mince est isotropique, les effets de bords près de la périphérie du substrat sont négligeables, les propriétés physiques sont invariantes dans le plan parallèle à l'interface, le gradient de contrainte dans la direction de l'épaisseur se dissipe uniformément dans le matériau et les déformations sont infinitésimales [42].

$$\text{Équation de Stoney : } \sigma_{SiO_2} = \frac{\kappa}{6} \cdot \frac{E_{PDMS}}{(1-\nu_{PDMS})} \cdot \frac{d_{PDMS}^2}{d_{SiO_2}} \quad (8)$$

La contrainte dans la couche mince est notée σ_{SiO_2} [MPa] et la courbure imposée au dispositif, qui représente la déformation mécanique, est notée κ [m]. En estimant un module de Young de $E_{PDMS} = 615$ kPa et avec un coefficient de Poisson de $\nu_{PDMS} = 0,5$, pour des épaisseurs de substrat de 1,7mm et de 0,2mm, on obtient les relations suivantes :

$$\begin{aligned} \text{a) } d_{PDMS} = 1,7\text{mm} &\rightarrow \sigma_{SiO_2} \approx 5 \cdot \kappa \\ \text{b) } d_{PDMS} = 200\mu\text{m} &\rightarrow \sigma_{SiO_2} \approx 0,07 \cdot \kappa \end{aligned}$$

Ces résultats corroborent ce qui est observé à la figure 5.6. En effet, pour une déformation mécanique identique, la couche mince déposée sur un substrat de PDMS plus épais (Fig. 5.6 a) subit une contrainte environ 70 fois plus élevée que celle imposée au SiO₂ déposée sur un substrat plus mince (fig. 5.6 b).

Suite à ces résultats, nous pouvons affirmer qu'il est possible de déposer une barrière de diffusion en SiO₂ sur du PDMS qui soit efficace et robuste. Cependant, pour les applications auxquelles est voué notre dispositif, il s'avère ardu de travailler avec un dispositif dont l'épaisseur est inférieure au millimètre. Il n'a donc malheureusement pas été possible d'effectuer un test électrochimique pour valider cette déposition. D'autres options ont donc été investiguées afin d'obtenir une barrière de diffusion sur un substrat de PDMS dont l'épaisseur est supérieure à 1mm.

5.2.3 Dépôt de Parylène sur le PDMS

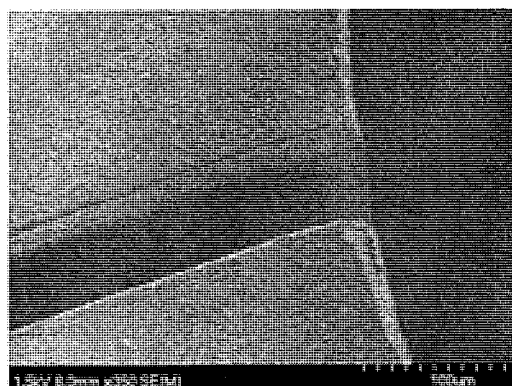
Le PDMS peut être recouvert d'une couche mince d'un autre polymère, le Parylène. Cette technique est utilisée dans de nombreuses applications biomédicales, notamment comme revêtement servant à encapsuler des implants rétiniens [43]. Le Parylène s'avère avoir une très faible perméabilité à l'eau et une bonne stabilité dans le temps. Ce matériau biocompatible est transparent aux longueurs d'onde du visible et ses propriétés physiques sont similaires à celles du PDMS, comme le montre le tableau 5.3.

Tableau 5.3 : Propriétés mécaniques et électriques du PDMS et du Parylène C.

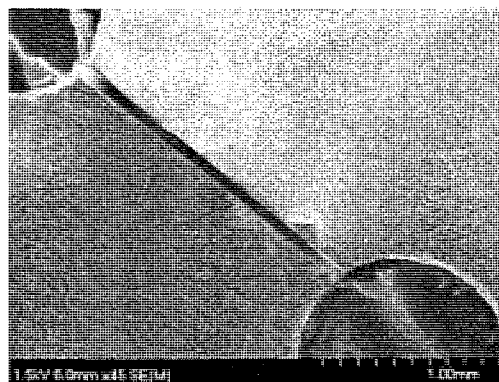
	Module de Young (MPa)	Coeff. de Poisson	Coeff. linéaire d'expansion thermique ($\cdot 10^{-6}/^{\circ}\text{C}$)	Résistivité volumique ($\cdot 10^{14}\text{ohm-cm}$)
PDMS*	0,36 – 0,87 [37]	0,5 [37]	310*	1,2*
Parylène **	2,8	0,4 [44]	35	880

*D'après la documentation de Dow Corning,**D'après la documentation de Special Coating System

L'intégrité mécanique de la couche mince de Parylène C est contrôlée par des observations MEB comme celles de la figure 5.7. La figure 5.7 a) montre le microcanal et un réservoir en PDMS, tel que représenté à la figure 4.1. La figure 5.7 b) montre ce PDMS une fois recouvert d'une couche mince de parylène.



a) PDMS



b) PDMS avec dépôt de 1µm de Parylène

Figure 5. 7 : Image MEB du dispositif en PDMS avec un microcanal et deux réservoirs.

La figure 5.7 b) montre que le Parylène se dépose de manière homogène sur le substrat, ce qui garantit l'isolation complète du dispositif. La figure 5.8 présente la courbe de calibration d'un dispositif (fig. 4.2) dont la surface est recouverte de 5 μm de Parylène.

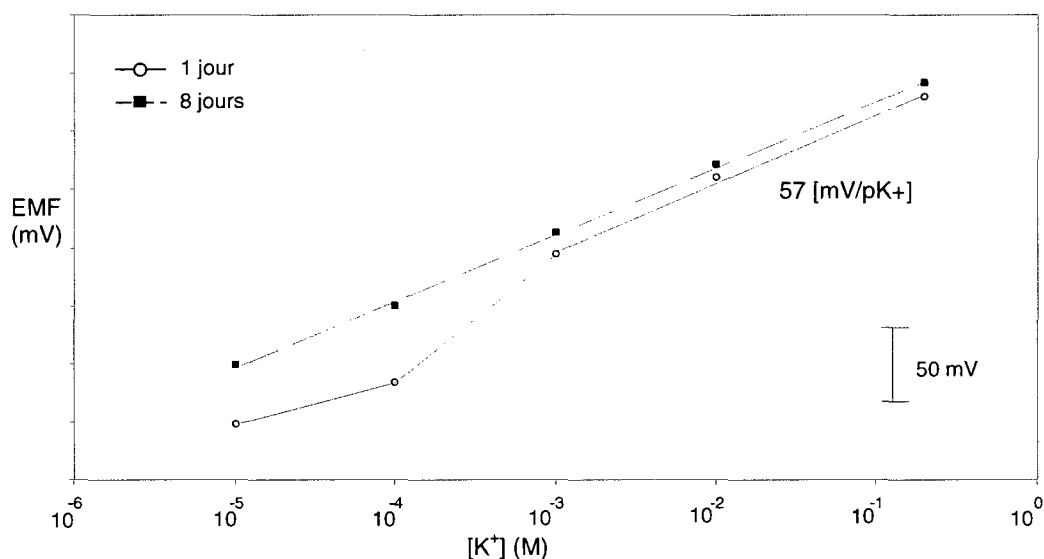


Figure 5. 8 : Courbe de calibration d'une *ISE* incorporée au PDMS sur lequel est déposé 5 μm de Parylène. La force électromotrice (*EMF*) en fonction de la concentration en ions potassium ($[K^+]$, échelle logarithmique) est mesurée directement après le séchage de l'*ISE* (jour 1) et après 8 jours.

Les courbes de la figure précédente prouvent que le Parylène est une très bonne barrière de diffusion pour le PDMS. On remarque un comportement super-Nernstien au jour 1, mais la réponse Nernstienne se stabilise à 57 mV/pK⁺ et se maintient après 8 jours. Ce matériel semble être idéal pour l'application des électrodes ioniques sélectives, puisque la sensibilité de l'électrode ne se dégrade pas après plusieurs jours.

5.3 Microélectrode ionique sélective intégrée au PDMS

Jusqu'à présent, on a prouvé que l'intégration d'une électrode ionique sélective dans le PDMS est possible grâce au dispositif de la figure 4.2 et on a travaillé à l'amélioration de sa stabilité dans le temps. Le prochain défi est de diminuer la taille de la macroISE pour en faire une microISE, telle qu'illustrée à la figure 4.1. La calibration de ce dispositif est présentée à la figure 5.9.

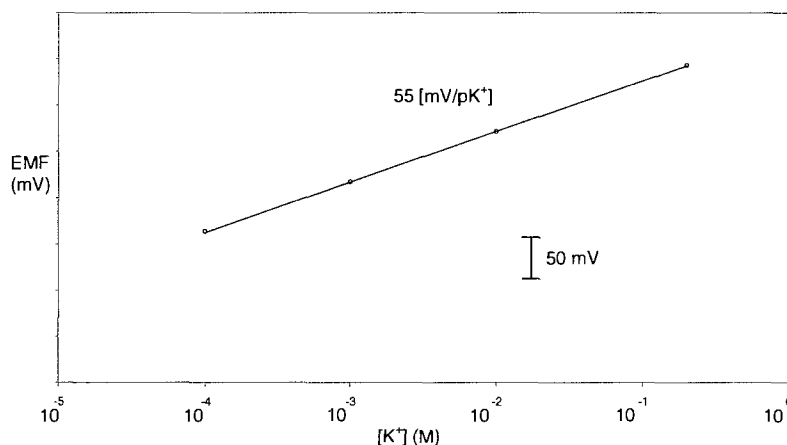


Figure 5. 9 : Courbe de calibration quasi-Nernstienne d'une microélectrode ionique sélective incorporée au PDMS. La force électromotrice (*EMF*) est en fonction de la concentration en ions potassium ($[K^+]$, échelle logarithmique).

La réponse Nernstienne de la courbe de la figure précédente est une preuve de concept préliminaire au niveau de l'intégration d'une microélectrode ionique sélective dans le PDMS, selon la configuration proposée à la figure 4.1.

5.4 Essais de détection de la mort cellulaire

5.4.1 MacroISE

Après avoir démontré qu'une macroISE et qu'une microISE peuvent être intégrées dans un substrat de PDMS, il est temps de tester ces électrodes en situation réelle, soit la détection en temps réel de la mort cellulaire oncotique. Pour valider ce concept, on utilise d'abord un dispositif avec une macroISE semblable à celui présenté à la figure 4.7 a).

La reproductibilité des mesures est assurée par le protocole expérimental très précis décrit à la section 4.3.2. L'enregistrement de la *EMF* est présenté à la figure 5.10 en fonction du temps. La courbe n'est pas continue, car elle ne montre que les mesures réalisées en mode statique, c'est-à-dire lorsque la pompe est arrêtée et qu'il n'y a aucun flux de solution dans la chambre fluidique.

Au tout début, la figure 5.10 montre une phase de stabilisation de l'électrode ionique sélective baignant dans un environnement de 150mM NaCl (10 premières minutes de l'essai). On introduit ensuite de l'eau déionisée (EDI, indiqué par une flèche à la figure 5.10). Le NaCl du puits cellulaire diffuse rapidement vers la chambre fluidique remplie d'EDI, ce qui provoque un choc hypoosmotique. Pour rétablir l'équilibre osmotique, la cellule se gorge d'eau et se gonfle fortement. La cellule active alors le mécanisme de *Regulatory Volume Decrease (RVD)*, processus présenté à la section 3.3. Le mécanisme *RVD* ne suffit pas pour stopper le gonflement et la cellule finit par éclater (phase appelée Lyse à la figure 5.10). Il y a alors libération de K^+ intracellulaire et on observe une nette augmentation du signal électrochimique *EMF*.

Le milieu hypoosmotique est maintenu pendant environ 10 min, période durant laquelle un pompage d'EDI de quelques secondes est effectué (perturbation de la *EMF* observée à la 19^e minute de l'essai). On procède ensuite à la phase de Rinçage en faisant passer dans la chambre fluïdique une solution de 150mM NaCl afin d'éliminer le potassium du puits cellulaire et de la chambre fluïdique. On termine par la calibration de la macro*ISE*.

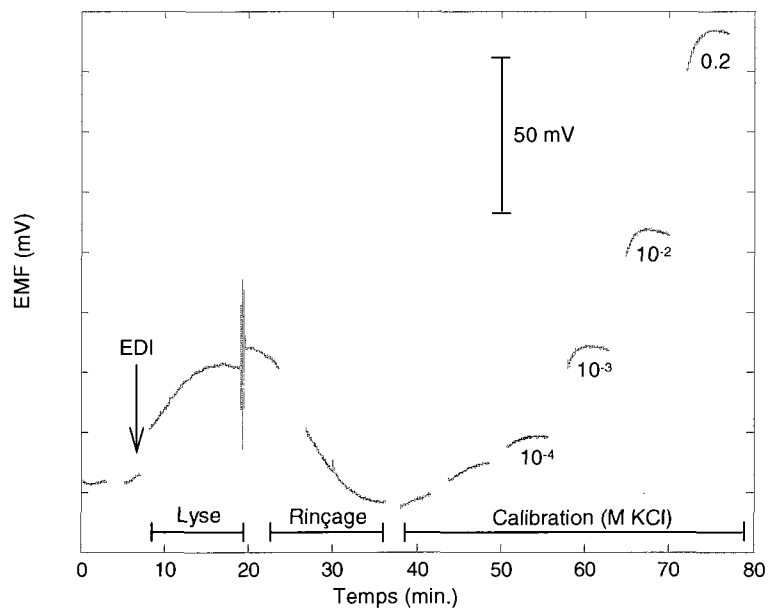


Figure 5.10 : Détection de flux potassiques extracellulaires avec une macro*ISE* intégrée dans une plateforme de PDMS avec barrière de diffusion (EDI : eau déionisée).

Les résultats de la figure 5.10 montrent qu'une *ISE* incorporée dans le PDMS est capable de détecter la mort cellulaire de façon significative. L'augmentation de la *EMF* enregistrée pendant la période où la mort cellulaire est provoquée (lyse) témoigne de la capacité du système à détecter une augmentation de concentration en ions K^+ dans la chambre cellulaire. Cette méthode laisse entrevoir la possibilité de quantifier la mort cellulaire, en comparant les mesures de *EMF* enregistrées lors de la lyse avec celles obtenues lors de la calibration [4].

5.4.2 MicroISE

L'essai de la figure 5.10 est une première validation du concept de détection de fonctions cellulaires avec une *ISE* incorporée au PDMS. La prochaine vérification à faire est de tester ce concept avec une *microISE*. Le schéma pour réaliser cette expérience est présenté à la figure 4.7 b) et les résultats électrochimiques de l'essai cellulaire sont présentés à la figure 5.11.

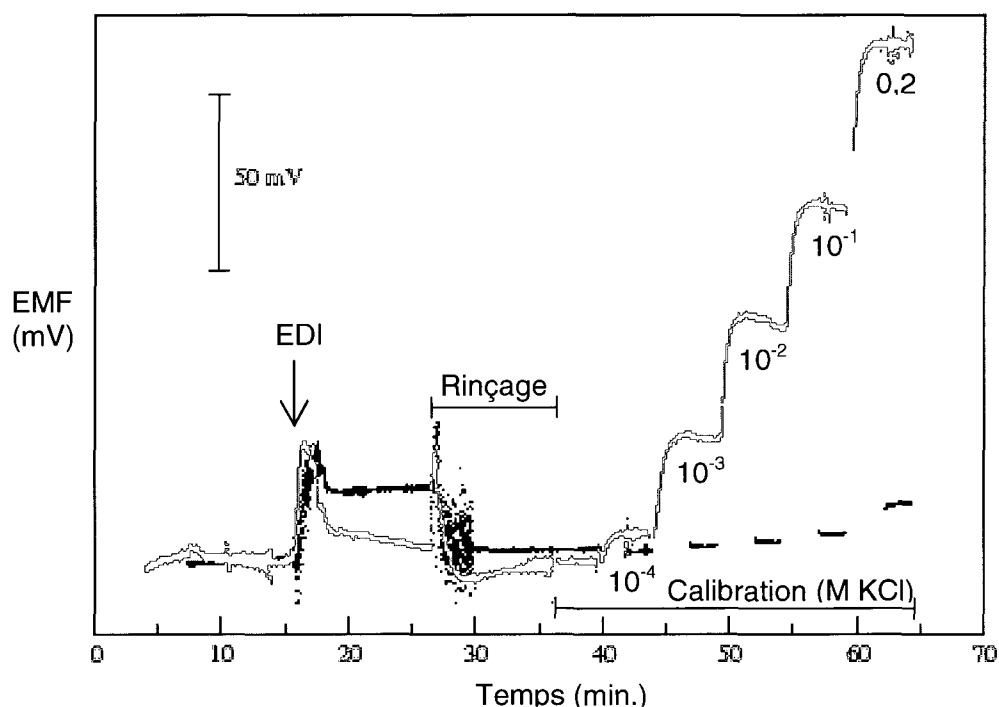


Figure 5.11 : Détection de flux potassiques extracellulaires avec une *microISE* intégrée dans une plateforme de PDMS (noir) et la courbe témoin (rouge)

Les données de la figure 5.11 montrent une courbe témoin (rouge) qui a été réalisée dans les mêmes conditions que la courbe d'essai cellulaire (noir), à l'exception qu'il n'y avait pas de cellule dans le micropuits. Dans les deux cas, on remarque une augmentation de

la différence de potentiel mesurée lors de la 17^e minute, qui représente une perturbation causée lors de l'injection d'eau déionisée (EDI). La différence de potentiel se stabilise une fois que l'équilibre ionique se rétablit via la diffusion des ions Na^+ et Cl^- du micropuits cellulaire vers la chambre fluidique. Ensuite, la courbe de l'essai cellulaire (noir) se stabilise, tandis que la courbe témoin (rouge) ne cesse de décroître vers sa valeur initiale. Ceci témoigne d'une augmentation de la concentration en potassium suite à l'induction de la mort cellulaire. Il est donc possible de détecter la mort cellulaire à l'aide d'une *microISE* en PDMS.

Lorsque l'on débute la phase de rinçage, les deux courbes présentent une perturbation de la *EMF* due à l'activation de la pompe. Au moment où ce régime dynamique arrête et que la solution entre en mode statique, les valeurs de *EMF* retournent vers leur état initial et demeurent stables jusqu'à la calibration. On dénote que les mesures sont instables en régime dynamique. Il se pourrait que le pompage de liquide crée des perturbations mécaniques au niveau de la *microISE*. Les futurs essais cellulaires avec les *microISE* devront être réalisés à débit inférieur à $22\mu\text{L/s}$.

On remarque à la figure 5.11 que la calibration effectuée à la fin de l'essai cellulaire révèle une sensibilité de la *microISE* nettement inférieure à celle obtenue lors de l'essai témoin. Cette perte de sensibilité peut être causée par divers phénomènes, notamment une perturbation au niveau du contact entre la membrane ionique sélective et le platine, un court-circuit entre la chambre fluidique et le platine, une perturbation de la surface active de l'électrode ionique sélective, etc.

Dans ce contexte d'essai cellulaire, il est intéressant d'étudier l'hypothèse de la perturbation de la surface active, qui pourrait être expliquée par le *biofouling*, c'est-à-dire les débris cellulaires absorbés à la surface du capteur qui réduisent considérablement la surface active de la microélectrode ionique sélective. Cette hypothèse est valable pour les essais préliminaires présentés ici, car le nombre de

cellules utilisées est très important (environ 2×10^6 cellules pour un micropuits cellulaire de 250nL). Ce problème de *biofouling* n'apparaît pas dans le cas des essais cellulaires avec les *microISE* en Si [4], puisque le nombre de cellules est beaucoup moindre (quelques centaines de cellules). Cet essai cellulaire préliminaire n'est pas représentatif d'un essai cellulaire typique auquel est destiné cette plateforme. Les prochains essais cellulaires seront effectués avec beaucoup moins de cellules (quelques milliers ou moins) et permettront sûrement de minimiser ce phénomène de *biofouling*. Par ailleurs, le *biofouling* n'a pas été observé lors de l'essai cellulaire avec une *macroISE* (fig. 5.10). Étant donné la grande surface de la *macroISE*, les débris organiques n'ont recouvert qu'une faible partie de sa surface active.

Afin d'éviter ce problème de *biofouling*, il est aussi possible d'intégrer la *microISE* à l'extérieur des micropuits cellulaires de manière à ce qu'elle ne soit pas en contact direct avec les cellules, mais seulement avec la solution extracellulaire. De cette façon, la *microISE* serait protégée des débris cellulaires grâce à une membrane poreuse, de la même manière que l'électrode de référence dans le schéma de la figure 4.7 b).

CONCLUSION

Le design de la plateforme microfluidique en polymère présentée dans ce projet propose plusieurs avantages par rapport à la plateforme microfluidique en silicium réalisée précédemment [4]. La transparence aux longueurs d'onde du visible de la nouvelle plateforme permet d'observer les cellules par microscopie inversée parallèlement avec l'analyse des mesures potentiométriques réalisées en temps réel par la microélectrode ionique sélective. De plus, l'utilisation de polymère permet la production rapide et peu coûteuse, ce qui génère des plateformes microfluidiques jetables, appropriées pour les essais biomédicaux stériles.

La technique de microfabrication par prototypage rapide [6] du PDMS est utilisée afin de vérifier le concept d'intégration d'une électrode ionique sélective à une plateforme polymérique. La caractérisation de la sensibilité du prototype avec une électrode ionique sélective macroscopique montre une réponse quasi-Nernstienne. Suite à cette preuve de concept, le prochain défi a été d'améliorer le temps de vie du capteur qui demeure sensible pour les 4 premiers jours, mais qui se dégrade en moins de 8 jours. Des tests de solvations ont confirmé que la détérioration prématurée du capteur est due à la dégradation du PDMS qui se gonfle et se dissout lorsqu'il est en contact avec le cyclohexanone de la membrane ionique sélective [26]. Puisqu'il n'est pas possible d'éliminer le cyclohexanone, la meilleure solution est de créer une barrière de diffusion entre le PDMS et la membrane ionique sélective.

Le dépôt d'une couche mince de SiO_2 présente toutes les caractéristiques requises pour la barrière de diffusion, soit la transparence au spectre du visible, une bonne résistance chimique et mécanique, une grande résistivité électrique et aucune interférence avec l'électrode ionique sélective [13, 16]. Le dépôt de SiO_2 par *PECVD* sur le PDMS présente plusieurs défis de conception. En effet, étant donné la grande différence de

coefficient d'expansion thermique et de module d'élasticité entre le SiO_2 et le PDMS, il a fallu développer un dépôt qui limite les contraintes générées dans la couche mince de SiO_2 et ainsi assurer l'intégrité de la barrière. Premièrement, il faut éviter de déposer à température trop élevée, car le grand rétrécissement du PDMS par rapport au SiO_2 lors du refroidissement crée des contraintes en compression dans la couche de SiO_2 . Grâce au contrôle des températures de dépôt (inférieures à 85°C), le relâchement des contraintes s'opère par la formation d'ondulations dans la couche mince, sans altérer l'étanchéité de la barrière de diffusion, ni sa transparence.

Ce qui est problématique avec le dépôt de SiO_2 par *PECVD*, ce sont les contraintes induites dans la couche mince par la déformation du PDMS lors de la manipulation de l'échantillon et qui fissurent la barrière de diffusion. Afin d'éviter ces craquements, un nouveau design de dépôt a été développé en s'inspirant de l'équation de Stoney, qui stipule que la contrainte est d'autant plus importante que l'écart d'épaisseur entre la couche mince et du PDMS est grand. Pour une plateforme microfluidique en PDMS d'environ $200\mu\text{m}$ d'épaisseur, les résultats dévoilent qu'une barrière de SiO_2 de 115nm demeure intacte. Cette découverte s'avère très utile pour la plateforme microfluidique qui intègre une microélectrode ionique sélective. Cependant, pour simplifier la manipulation, le premier prototype en PDMS intégrant une électrode ionique sélective macroscopique doit avoir une épaisseur de 1 mm , ce qui engendre des fissures dans la couche de SiO_2 . Une autre barrière de diffusion doit alors être envisagée. Une couche mince de Parylène, polymère qui s'adapte bien aux déformations [45], demeure intacte et permet d'améliorer considérablement le temps de vie de l'électrode intégrée au PDMS. Ce prototype a donc permis de franchir une autre étape clé du projet, soit la création d'une électrode ionique sélective intégrée à une plateforme polymérique dont la sensibilité demeure stable pour plus d'une semaine.

Suite à ces avancées, la taille de l'électrode incorporée au PDMS a été réduite afin de créer une microélectrode ionique sélective. Cette miniaturisation ouvre la porte à la création d'une plateforme microfluidique polymérique intégrant plusieurs micropuits cellulaires ayant chacun sa propre microélectrode ionique sélective. Le développement des essais réalisés en parallèle est un enjeu primordial dans le domaine des laboratoires-sur-puce afin d'accroître leur efficacité.

Au cours de ce projet, le PDMS a été privilégié pour la création de prototypes de la plateforme microfluidique polymérique, car il est facile et rapide à microfabriquer. Dans une prochaine version de la plateforme polymérique, il sera primordial de vérifier s'il existe un polymère résistant aux composants de la membrane ionique sélective, notamment le cyclohexanone. Cependant, il ne faut pas négliger les caractéristiques essentielles de transparence et de biocompatibilité. De plus, il serait intéressant de créer des plateformes en polymères durs, comme le PMMA, afin d'augmenter la stabilité mécanique de la microélectrode ionique sélective. Une plateforme dure permettrait également de réduire les perturbations induites au niveau des mesures potentiométriques réalisées en régime microfluidique dynamique. Un autre défi pour la suite du projet sera d'éviter la réduction de la surface active de la membrane ionique sélective causée par le *biofouling*. Une solution intéressante à ce problème est d'intégrer la microélectrode juste à l'extérieur des micropuits cellulaires de manière à ce qu'elle ne soit pas en contact direct avec le milieu extracellulaire.

Le développement de la plateforme en PDMS et les essais cellulaires réalisés dans ce projet ont permis de détecter la mort cellulaire, par l'entremise des flux potassiques extracellulaires. Ce succès a validé le concept fondamental du projet, soit la détection de fonctions cellulaires à l'aide d'une microISE intégrée à une plateforme en polymère. La technologie développée promet d'être en mesure de quantifier la mort cellulaire, de façon similaire à ce qui a été réalisé grâce à la plateforme de silicium préalablement réalisée [4].

LISTE DES RÉFÉRENCES

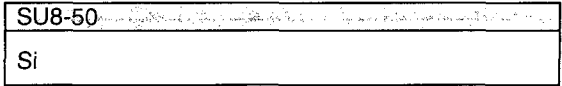
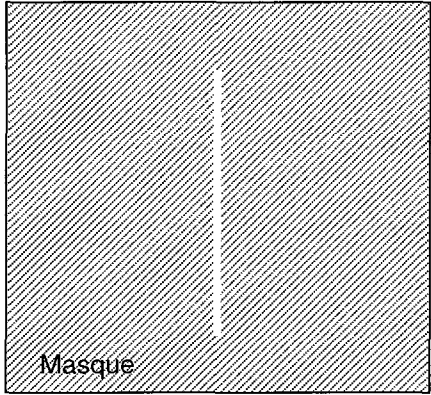
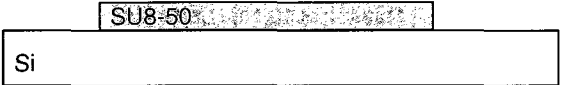



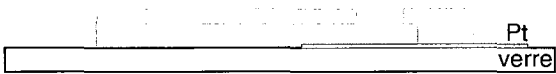
- [1] K. Bhadriraju and C. S. Chen, "Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing," *Drug Discov Today*, vol. 7, pp. 612-20, 2002.
- [2] Z. Wang, M. C. Kim, M. Marquez, and T. Thorsen, "High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis," *Lab Chip*, vol. 7, pp. 740-5, 2007.
- [3] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics," *Nature*, vol. 442, pp. 368-373, 2006.
- [4] S. Generelli, R. Jacquemart, N. F. De Rooij, M. Jolicoeur, M. Koudelka-Hep, and O. T. Guenat, "Potentiometric platform for the quantification of cellular potassium efflux," *Lab on a Chip*, vol. 8, pp. 1210-1215, 2008.
- [5] C. D. Bortner and J. A. Cidlowski, "Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis," *Arch Biochem Biophys*, vol. 462, pp. 176-88, 2007.
- [6] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides, "Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)," *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 4974-4984, 1998.
- [7] J. El-Ali, P. K. Sorger, and K. F. Jensen, "Cells on chips," *Nature*, vol. 442, pp. 403-411, 2006.
- [8] C. S. Chen, X. Jiang, and G. M. Whitesides, "Microengineering the environment of mammalian cells in culture," *MRS Bulletin*, vol. 30, pp. 194-201, 2005.
- [9] M. S. Kim, Y. Ju Hun, and P. Je-Kyun, "A microfluidic platform for 3-dimensional cell culture and cell-based assays," *Biomedical Microdevices*, 2007.
- [10] W. Y. Liao, C. H. Weng, G. B. Lee, and T. C. Chou, "Development and characterization of an all-solid-state potentiometric biosensor array microfluidic device for multiple ion analysis," *Lab Chip*, vol. 6, pp. 1362-8, 2006.
- [11] E. Lindner and R. P. Buck, "Microfabricated Potentiometric Electrodes and their in vivo applications," *Analytical Chemistry*, vol. 72, pp. 336A-345A, 2000.
- [12] D. J. Beebe, G. A. Mensing, and G. M. Walker, "Physics and Applications of Microfluidics in Biology," *Annual Reviews of Biomedical Engineering*, vol. 4, pp. 261-286, 2002.
- [13] G. T. Roman, T. Hlaus, K. J. Bass, T. G. Seelhammer, and C. T. Culbertson, "Sol-gel modified poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices with high electroosmotic mobilities and hydrophilic channel wall characteristics," *Analytical Chemistry*, vol. 77, pp. 1414-1422, 2005.
- [14] A. J. Tudös, G. A. L. Besselink, and R. B. M. . Schasfoort, "Trends in miniaturized total analysis systems for point-of-care testing in clinical chemistry," *Lab Chip*, vol. 1, pp. 83-95, 2001.
- [15] G. T. Roman and C. T. Culbertson, "Surface engineering of poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices using transition metal sol-gel chemistry," *Langmuir*, vol. 22, pp. 4445-4451, 2006.

- [16] A. R. Abate, D. Lee, T. Do, C. Holtze, and D. A. Weitz, "Glass coating for PDMS microfluidic channels by sol-gel methods," *Lab Chip*, vol. 8, pp. 516-8, 2008.
- [17] N. Bowden, W. T. S. Huck, K. E. Paul, and G. M. Whitesides, "The controlled formation of ordered, sinusoidal structures by plasma oxidation of an elastomeric polymer," *Applied Physics Letters*, vol. 75, pp. 2557-2559, 1999.
- [18] T. Sordel, F. Kermarec-Marcel, S. Garnier-Raveaud, N. Glade, F. Sauter-Starace, C. Pudda, M. Borella, M. Plissonnier, F. Chatelain, F. Bruckert, and N. Picollet-D'hahan, "Influence of glass and polymer coatings on CHO cell morphology and adhesion," *Biomaterials*, vol. 28, pp. 1572-84, 2007.
- [19] Y. S. Shin, K. Cho, S. H. Lim, S. Chung, S.-J. Park, C. Chung, D.-C. Han, and J. K. Chang, "PDMS-based micro PCR chip with Parylene coating," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 13, pp. 768-774, 2003.
- [20] E. Bakker, P. Buhlmann, and E. Pretsch, "Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 1. General Characteristics," *Chem Rev*, vol. 97, pp. 3083-3132, 1997.
- [21] C. Fry, H. and S. Langley, E.M., *Ion-selective electrodes for biological systems*. Amsterdam: harwood academic publishers, 2001.
- [22] D. Bodas and C. Khan-Malek, "Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment-An SEM investigation," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 123, pp. 368-373, 2007.
- [23] V. Roucoules, A. Ponche, A. Geissler, F. Siffer, L. Vidal, S. Ollivier, M. F. Vallat, P. Marie, J. C. Voegel, P. Schaaf, and J. Hemmerle, "Changes in silicon elastomeric surface properties under stretching induced by three surface treatments," *Langmuir*, vol. 23, pp. 13136-13145, 2007.
- [24] K. Boxshall, M.-H. Wu, Z. Cui, Z. Cui, J. F. Watts, and M. A. Baker, "Simple surface treatments to modify protein adsorption and cell attachment properties within a poly(dimethylsiloxane) micro-bioreactor," *Surface and Interface Analysis*, vol. 38, pp. 198-201, 2006.
- [25] J. N. Lee, C. Park, and G. M. Whitesides, "Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices," *Analytical Chemistry*, vol. 75, pp. 6544-6554, 2003.
- [26] J. Chen, H. Zhuang, J. Zhao, and J. A. J. Gardella, "Solvents effects on polymer surface structure," *Surface and interface analysis*, vol. 31, pp. 713-20, 2001.
- [27] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Essential Cell Biology*, 2 ed. New York: Garland Science, 2004.
- [28] J. R. Trimarchi, L. Liu, P. J. S. Smith, and D. L. Keefe, "Noninvasive Measurement of Potassium Efflux as an Early Indicator of Cell Death in Mouse Embryos," *Biology of Reproduction*, vol. 63, pp. 851-7, 2000.
- [29] S. L. Fink and B. T. Cookson, "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells," *Infect Immun*, vol. 73, pp. 1907-16, 2005.
- [30] S. P. Yu, L. M. T. Canzoniero, and D. W. Choi, "Ion homeostasis and apoptosis," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 13, pp. 405-11, 2001.

- [31] F. Lang, M. Foller, K. S. Lang, P. A. Lang, M. Ritter, E. Gulbins, A. Vereninov, and S. M. Huber, "Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death," *J Membr Biol*, vol. 205, pp. 147-57, 2005.
- [32] P. R. Junankar, A. Karjalainen, and K. Kirk, "Osmotic swelling activates two pathways for K⁺ efflux in a rat hepatoma cell line," *Cell Physiol Biochem*, vol. 14, pp. 143-54, 2004.
- [33] J. C. McDonald and G. M. Whitesides, "Poly(dimethylsiloxane) as a Material for fabricating Microfluidic Devices," *Accounts of Chemical research*, vol. 35, pp. 491-499, 2001.
- [34] O. T. Guenat, S. Generelli, N. F. de Rooij, M. Koudelka-Hep, F. Berthiaume, and M. L. Yarmush, "Development of an array of ion-selective microelectrodes aimed for the monitoring of extracellular ionic activities," *Anal Chem*, vol. 78, pp. 7453-60, 2006.
- [35] L. A. MacQueen, J. Zikovsky, G. Dennler, M. Latreche, G. Czeremuszkin, and M. R. Wertheimer, "PECVD of nanocrystalline Si layers on high-Tg polymer substrates," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 3, pp. 58-65, 2006.
- [36] W.-J. Ho, C.-J. Yuan, and O. Reiko, "Application of SiO₂-poly(dimethylsiloxane) hybrid material in the fabrication of amperometric biosensor," *Analytica Chimica Acta*, vol. 572, pp. 248-252, 2006.
- [37] J. E. Mark, *Polymer Data Handbook*, 2 ed. New York: Oxford University Press, 1999.
- [38] B. D. Iverson and S. V. Garimella, "Recent advances in microscale pumping technologies: a review and evaluation," presented at Microfluid Nanofluid, 2008.
- [39] L. Doucet and G. Carlotti, "Elastic properties of silicate glass and spin-on glass thin films," presented at Materials Research Society Symposium, Boston, USA, 1994.
- [40] I. Idris and O. Sugiura, "Film characteristics of low-temperature plasma-enhanced chemical vapor deposition silicon dioxide using tetraisocyanatesilane and oxygen," *Japanese Journal of Applied Physics, Part 1: Regular Papers & Short Notes & Review Papers*, vol. 37, pp. 6562-6568, 1998.
- [41] J. Genzer and J. Groenewold, "Soft matter with hard skin: From skin wrinkles to templating and material characterization," *Soft Matter*, vol. 2, pp. 310-23, 2006.
- [42] S. Huang and X. Zhang, "Extension of the Stoney formula for film-substrate systems with gradient stress for MEMS applications," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 16, pp. 382-389, 2006.
- [43] I. Krisch and B. J. Hosticka, "Restoring visual perception using microsystem technologies: engineering and manufacturing perspectives," *Acta Neurochir. Suppl.*, vol. 97, pp. 473-480, 2007.
- [44] T. Harder, A., T.-J. Yao, Q. He, C.-Y. Shih, and Y.-C. Tai, "Residual Stress in Thin-Film Parylene-C," *Micro Electro Mechanical Systems*, pp. 435-438, 2002.
- [45] Y. S. Heo, L. M. Cabrera, J. W. Song, N. Futai, Y. C. Tung, G. D. Smith, and S. Takayama, "Characterization and resolution of evaporation-mediated osmolality shifts that constrain microfluidic cell culture in poly(dimethylsiloxane) devices," *Anal Chem*, vol. 79, pp. 1126-34, 2007.

ANNEXE I : MICROFABRICATION DE LA PLATEFORME

Voici le détail de la microfabrication du moule en Si/SU8-50, ainsi que les étapes de prototypage rapide. Les schémas sont présentés sous une vue en coupe.

<u>Étapes</u>	<u>Schémas</u>
Étalement de la photorésine epoxy SU8-50 (épaisseur de 65 μ m) sur une gaufre de Si et recuit	
Masque souple avec le motif d'un microcanal de 50 μ m de largeur	
Photolithographie et recuit	
Moulage du PDMS	
Démoulage et découpage du PDMS	
Perçage de l'entrée et la sortie du microcanal	
Fermeture du microcanal : Plasma oxygène pour lien irréversible avec le verre (avec pistes de Pt)	

Vue de dessus du dispositif

